

Parvovirus B19-assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie: Dysregulation der inflammatorischen Signaltransduktion durch parvovirale Proteine

Dissertation

der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Eberhard Karls Universität Tübingen
zur Erlangung des Grades eines
Doktors der Naturwissenschaften
(Dr. rer. nat.)

vorgelegt von

**Dipl.-Biologin Friederike Nora Utta
aus Reutlingen**

Tübingen, 2013

Tag der mündlichen Qualifikation:

Dekan:

1. Berichterstatter:

2. Berichterstatter:

16. April 2013

Prof. Dr. Wolfgang Rosenstiel

Prof. Dr. C.-Thomas Bock

Prof. Dr. Nikolaus Blin

„Alles wird gut!“

C.-Thomas Bock

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich den Menschen danken, die auf vielfältige Weise zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben:

Zuallererst möchte ich meinem Arbeitsgruppenleiter, Chef und Betreuer Prof. Thomas Bock ein großes Dankeschön aussprechen. Vielen Dank für die wissenschaftliche Anleitung, für die Bereitstellung des Themas, für deine ansteckende gute Laune und deine positive Einstellung zu allem. Und du hattest recht: „Alles wird gut!“

Ich möchte Prof. Reinhard Kandolf für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die anregenden wissenschaftlichen Diskussionen während der Seminare danken.

Weiterhin möchte ich meinem Doktorvater Prof. Nikolaus Blin (Molekulare Genetik, Universität Tübingen) für die wissenschaftliche Unterstützung meiner Arbeit und die freundlichen Gespräche danken.

Rosa Mammato! Oh du beste aller TAs! Jeder Arbeitstag (vor allem die Freitage) und jede Mittagspause waren einfach erfrischend mit dir. Vielen Dank für dein allzeit offenes Ohr und für die labortechnische Unterstützung, besonders bei den Proteininteraktions-Experimenten mit Greifswald.

Ein großes Dankeschön geht auch an meine beiden Post-Docs Evelyn Fein und Steffi Simonovic. Ihr wart wissenschaftlich und freundschaftlich stets für mich da. Danke auch besonders für die vielen wertvollen Stunden auf den SFB-Tagungen und fürs Korrekturlesen. Allen Doktoranden, Diplomanden und Praktikanten möchte ich auch danken. Ihr haben dafür gesorgt, dass stets gute Stimmung und ein frischer Wind im Labor herrschte. Namentlich erwähnt seien an dieser Stelle Marius Brandt, Martin Wolf, Ariane Kirste, Agnes Bryniok und Felicitas Opdenhövel. Es ist schön, dass aus Laborbekanntschaften Freundschaften geworden sind!

Vielen, vielen Dank an meine SFB-Kooperationspartnerin Dr. Elke Hammer (Universität Greifswald). Du hast die Interaktionsstudie mit mir durchgeführt. Danke für die freundschaftlichen Gespräche auf den SFB-Symposien und am Telefon.

Danke an die beiden Sekretärinnen Doris Rilling und Brigitte Falkner für die Versorgung mit Schreibmaterialien und süßer Nervenahrung. Danke an alle anderen Laborkollegen, Prof. Karin Klingel und der „Diagnostik“. Vielen Dank für die Hilfe, die technischen Tricks und Kniffe und die netten Gespräche zwischen Tür und Angel.

Danke an meinen Freund Christian Schaff. Du hast mir den Laboralltag versüßt und nach Feierabend dafür gesorgt, dass ich den Alltag vergessen kann.

Der größte Dank gilt meinen Eltern. Ich konnte mich immer an Euch wenden, wenn ich Sorgen und Probleme oder mal keine Lust zu kochen hatte. Eure volle Unterstützung in jeglicher Hinsicht hat es mir ermöglicht, dass ich euch nun auf so einem Dokument dafür danken kann!

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	TAXONOMIE DER PARVOVIREN	1
1.2	PARVOVIRUS B19	2
1.2.1	Morphologie	2
1.2.2	Struktur des Parvovirus B19-Genoms	3
1.2.3	Parvovirus B19-Replikation	5
1.2.4	Zelltropismus und Permissivität von Parvovirus B19	6
1.3	PATHOGENITÄT DES PARVOVIRUS B19	8
1.3.1	Parvovirus B19-assoziierte Krankheiten	8
1.3.1.1	Parvovirus-assoziierte Myokarditis	10
1.3.1.2	Endotheliale Dysfunktion	12
1.4	GENOMDIVERSITÄT VON PARVOVIRUS B19	13
1.4.1	Genetische Varianz	13
1.4.2	Unterteilung in B19V-Subtypen	14
1.4.3	Mutationen im Parvovirus B19-Genom	15
1.4.4	B19V-Varianten und assoziierte Krankheiten	16
1.5	DAS NICHT-STRUKTUR-PROTEIN NS1 VON B19V	17
1.5.1	Aufbau und Funktionen	17
1.5.1.1	NTP-Bindestelle	18
1.5.2	Zellzyklusarrest durch B19V-NS1	19
1.5.3	Zytotoxizität und Apoptose durch B19V-NS1	20
1.6	MODULATION VON SIGNALWEGEN DURCH B19V-NS1	22
1.6.1	MAPK-Signalwege	23
1.6.1.1	p44/42-ERK1/2	24
1.6.1.2	p38-MAPK	25
1.6.2	eNOS	26
1.7	ZIELSETZUNG DER ARBEIT	30
2	Material und Methoden	31
2.1	ZELLKULTUR	31
2.1.1	Zelllinien und Zellkulturmedien	31
2.1.2	Kryokonservierung	32
2.2	ISOLATION VON PARVOVIRUS B19-PARTIKELN AUS HUMANEM SERUM	32
2.2.1	Aufreinigung der Parvovirus B19-Partikel mittels Saccharosekissen	32
2.2.2	Quantifizierung der B19V-Konzentration	33

2.3 ZELLKULTUREXPERIMENTE	34
2.3.1 <i>Transfektion von Plasmid-DNA in adhärenente Zellen</i>	34
2.3.2 <i>Infektion von UT-7/EPO-Zellen mit B19V</i>	34
2.3.3 <i>Konditionelle NS1-Expression in hMEC-1-Zellen</i>	35
2.3.3.1 <i>Funktionsweise des Tet (Tetracyclin)-on-Systems.....</i>	35
2.4 RNA-ISOLATION UND RT-qPCR.....	36
2.4.1 <i>DNase-Verdau</i>	37
2.4.2 <i>Reverse Transkription und qPCR.....</i>	37
2.5 AUSWERTUNG DER QUANTITATIVEN PCR.....	38
2.6 GENEXPRESSIONS-ANALYSEN	38
2.6.1 <i>MAPK Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array-Analysen</i>	38
2.6.1.1 <i>Agarosegelelektrophorese für RNA</i>	39
2.6.1.2 <i>Reverse Transkription und Real-Time-PCR.....</i>	39
2.6.2 <i>Analyse der eNOS-Signalgebung mittels TaqMan Array</i>	40
2.7 PROTEINANALYSEN	40
2.7.1 <i>Zellyse und Konzentrationsbestimmung</i>	40
2.7.2 <i>Herstellung der Positivkontrollen für Western Blot-Experimente.....</i>	41
2.7.2.1 <i>Phospho-p44/42-ERK.....</i>	41
2.7.2.2 <i>Phospho-p38-MAPK.....</i>	42
2.7.3 <i>SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE).....</i>	42
2.7.4 <i>Semi-dry Westernblot.....</i>	43
2.7.5 <i>Spezifische Immunreaktion</i>	44
2.7.6 <i>Entfernen gebundener Antikörper (Stripping)</i>	45
2.7.7 <i>Auswertung der Western Blot Analysen</i>	45
2.8 IDENTIFIZIERUNG DER PROTEININTERAKTION VON B19V-NS1	45
2.8.1 <i>Generierung von Expressionsplasmiden mit FLAG-markiertem B19V-NS1.....</i>	46
2.8.1.1 <i>Klonierung von pcDNA-FLAG-NS1</i>	46
2.8.1.1.1 <i>Gradienten-PCR</i>	46
2.8.1.1.2 <i>Agarosegelelektrophorese für DNA</i>	47
2.8.1.1.3 <i>Restriktionsverdau und Ligation.....</i>	48
2.8.1.1.4 <i>Selektion der Klone</i>	49
2.8.1.2 <i>Klonierung von pcDNA-NS1-FLAG.....</i>	50
2.8.1.2.1 <i>Gerichtete Mutagenese</i>	50
2.8.2 <i>Klonierung des FLAG-markierten NS1 in den Expressionsvektor pcDNA3.1.....</i>	52
2.8.2.1 <i>Klonierung des Kontrollvektors pcDNA-FLAG.....</i>	53
2.8.3 <i>Maxipräparation</i>	53

2.8.4	<i>Ermittlung der Konzentration des Selektions-Antibiotikums für stabile Transfektionen</i>	54
2.8.5	<i>Stabile Transfektion</i>	54
2.8.6	<i>DNA-Analyse der stabilen FLAG-Zelllinien</i>	55
2.8.6.1	<i>Phenol/Chlorophorm-Extraktion</i>	55
2.8.6.2	<i>PCR-Nachweis der integrierten NS1-Konstrukte</i>	56
2.8.7	<i>PCR-Nachweis der transfizierten FLAG-Kontrollzellen</i>	56
2.8.8	<i>Expressionsnachweis von NS1-FLAG/FLAG-NS1 auf RNA-Ebene</i>	57
2.8.9	<i>Immunpräzipitation der FLAG-NS1-Fusionsproteine</i>	57
2.8.10	<i>Expressionsnachweis der NS1-FLAG-Gene auf Proteinebene</i>	57
2.8.11	<i>SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture) und Immunpräzipitation</i>	58
2.8.12	<i>Präparation von Peptidextrakten für quantitative Proteomanalysen</i>	59
2.8.13	<i>Massenspektrometrie</i>	59
2.8.13.1	<i>Datenbank-Suche</i>	60
2.8.13.2	<i>Quantitative Analyse</i>	60
2.9	GENOTYPISIERUNG PATIENTENSPEZIFISCHER PARVOVIRUS B19 GENOM-ISOLATE	61
2.9.1	<i>Auswahl der Proben</i>	61
2.9.2	<i>PCR-Amplifikation verschiedener Genom-Bereiche von Parvovirus B19</i>	61
2.9.2.1	<i>Amplifikation der NTP-Bindestelle aus B19V-NS1</i>	62
2.9.2.2	<i>Amplifikation des kodierenden Bereichs von Parvovirus B19</i>	62
2.9.2.3	<i>Amplifikation des Bereichs NS1/VP1u aus Parvovirus B19</i>	63
2.9.3	<i>Sequenzierungs-PCR nach Sanger</i>	64
2.9.3.1	<i>Fällung und Sequenzierung der Produkte der Sequenzierungs-PCR</i>	64
2.9.4	<i>Sequenzanalysen</i>	65
2.10	GERÄTE UND TECHNIK	66
3	Ergebnisse	67
3.1	EINFLUSS VON PARVOVIRUS B19 AUF DIE MAPK-SIGNALTRANSDUKTION	67
3.1.1	<i>Real-Time PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von B19V-NS1</i>	68
3.1.2	<i>Aktivierung von p38-MAPK nach Expression von B19V-NS1 in hMEC-1</i>	69
3.1.3	<i>Aktivierung von p44/42-ERK nach Expression von B19V-NS1 in hMEC-1</i>	70
3.1.4	<i>Bedeutung der NTP-Domäne in B19V-NS1-Genom für die Modulation der MAPK-Signaltransduktion</i>	71
3.1.5	<i>Real-Time PCR zum Nachweis von B19V-NS1- und B19V-VP1/2-mRNA-Expression in B19V- infizierten UT-7/EPO-Zellen</i>	72
3.1.6	<i>Aktivierung von p38-MAPK nach Infektion von permissiven UT-7/EPO mit Parvovirus B19</i>	73

3.1.7	<i>Aktivierung von p44/42-ERK nach Infektion von permissiven UT-7/EPO mit Parvovirus B19.....</i>	74
3.1.8	<i>Untersuchungen zur Expression von MAPK-assoziierten Genen</i>	74
3.1.8.1	<i>Nachweis der B19V-NS1-Expression in induzierten hMEC-NS1-Zellen.....</i>	75
3.1.8.1.1	<i>Fluoreszenzmikroskopie von induzierbaren hMEC-NS1-Zellen</i>	75
3.1.8.1.2	<i>Nachweis der B19V-NS1-Expression in induzierten hMEC-NS1-Zellen.....</i>	76
3.1.8.2	<i>MAPK-Genexpressions-Profilung nach B19V-NS1-Expression in humanen Endothelzellen</i>	76
3.2	UNTERSUCHUNGEN ZUM EINFLUSS VON PARVOVIRUS B19 AUF DEN ENOS-SIGNALWEG	78
3.2.1	<i>eNOS-Genexpressions-Profilung nach B19V-NS1-Expression in humanen Endothelzellen</i>	79
3.3	BESTIMMUNG DER PARVOVIRUS B19-NS1-PROTEIN-INTERAKTIONSPARTNER	82
3.3.1	<i>PCR-Nachweis der transfizierten pcDNA-Plasmide in humanen Endothelzellen</i>	82
3.3.2	<i>Nachweis der mRNA-Expression von NS1 und FLAG in stabil transgenen hMEC-NS1-FLAG bzw. hMEC-FLAG-NS1-Zellen</i>	83
3.3.3	<i>Western Blot Analyse zum Nachweis des FLAG-markierten NS1-Fusionsproteins.....</i>	84
3.3.4	<i>Proteomanalyse mittels SILAC (Stable isotope labeling by amino acids in cell culture).....</i>	85
3.3.4.1	<i>Isotopische Markierung der stabilen FLAG-NS1-Zelllinien, Immunpräzipitation und massenspektrometrische Messungen.....</i>	86
3.4	MUTATIONSANALYSEN VON PARVOVIRUS B19	88
3.4.1	<i>Identifizierung von Mutationen in konservierten Bereichen der NS1-NTP-Bindestelle</i>	88
3.4.2	<i>Sequenzanalysen des kodierenden Bereichs von Parvovirus B19 Genotyp 1 und 2.....</i>	90
3.4.3	<i>Sequenzanalysen der B19V-NS1/VP1u-Region in Genotyp 2, Varianten a und b</i>	93
4	Diskussion	95
4.1	INTERFERENZ VON PARVOVIRUS B19-NS1 MIT DER INFLAMMATORISCHEN MAPK-SIGNALTRANSDUKTION	95
4.1.1	<i>Aktivierung des MAPK-Signalkaskade durch B19V-NS1-Expression</i>	96
4.1.2	<i>Einfluss von B19V-NS1-Mutanten (NTP-Bindedomäne) auf die MAPK-Signaltransduktionen.....</i>	98

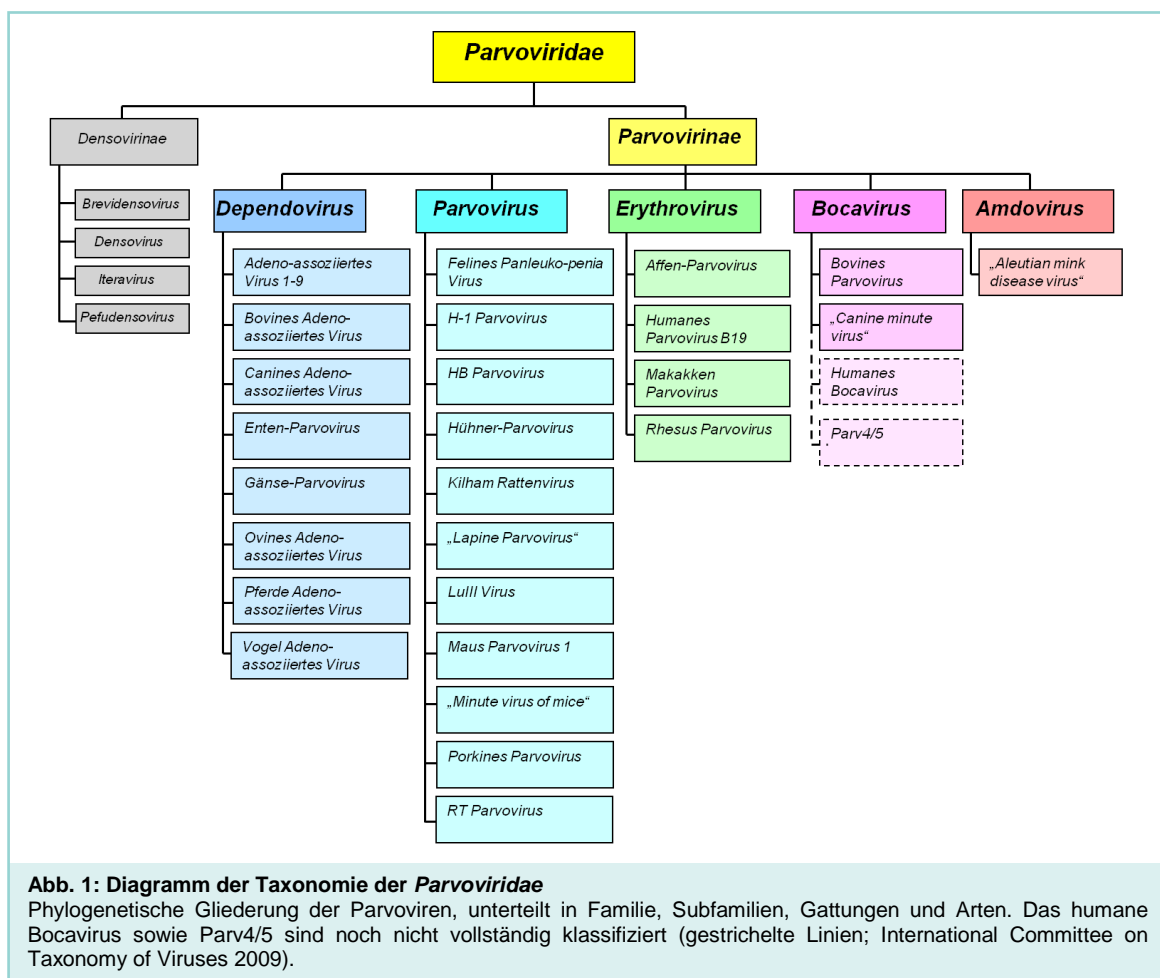
4.1.3	<i>Aktivierung des MAPK-Signalkaskade durch B19V-Infektion</i>	99
4.1.4	<i>Interaktion des B19V-NS1-Proteins mit dem MAPK-Signalweg</i>	101
4.1.5	<i>Regulation der MAPK-Zielgene durch B19V-NS1</i>	103
4.1.5.1	Hochregulierte Zielgene des MAPK-Signalwegs nach B19V-NS1-Expression.	103
4.1.5.2	Supprimierte Zielgene des MAPK-Signalwegs nach B19V-NS1-Expression.	107
4.2	EINFLUSS VON B19V AUF DEN eNOS-SIGNALWEG	107
4.2.1	<i>Regulation von eNOS-Zielgenen durch B19V-NS1</i>	108
4.2.1.1	Supprimierte Zielgene des eNOS-Signalwegs nach B19V-NS1-Expression	109
4.2.1.1.1	Zytoskelettbestandteile und eNOS-Transport	109
4.2.1.1.2	Zytokine, Rezeptoren, Kanäle	110
4.2.1.1.3	Intrazelluläre Signaltransduktion	111
4.2.1.2	Hochregulierte Zielgene des eNOS-Signalwegs nach B19V-NS1-Expression	112
4.2.1.2.1	Rezeptorklassen und Liganden	112
4.2.1.2.2	Intrazelluläre Signaltransduktion und <i>Second messenger</i>	116
4.3	INTERAKTION ZWISCHEN PARVOVIRUS B19-NS1 UND ZELLULÄREN PROTEINEN..	117
4.3.1	<i>Identifikation direkter Interaktionspartner des B19V-NS1-Proteins</i>	118
4.3.1.1	B19V-NS1-Assoziation mit Faktoren der Proteinprozessierung	118
4.3.1.2	B19V-NS1-Assoziation mit Proteinen der DNA-Prozessierung	119
4.3.1.3	B19V-NS1-Assoziation mit Transkriptionsfaktoren	120
4.3.1.4	B19V-NS1-Assoziation mit Bestandteilen inflammatorischer Prozesse	121
4.3.1.5	B19V-NS1-Assoziation mit weiteren zellulären Proteinen	122
4.4	MUTATIONSANALYSEN VON PARVOVIRUS B19	123
4.4.1	<i>Mutationen der NTP-Bindestelle</i>	123
4.4.2	<i>Intergenotypische Divergenzen im kodierenden Genombereich des Parvovirus B19</i>	125
4.4.3	<i>Betrachtung des hochvariablen NS1/VP1u-Bereichs innerhalb der Genotyp-2-Varianten von Parvovirus B19</i>	125
5	Zusammenfassung	128
6	Anhang	129
6.1	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	129
6.2	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	132
6.3	TABELLENVERZEICHNIS	133

6.4 AUFLISTUNG ALLER UNTERSUCHTEN ZIELGENE DER MAPK- UND eNOS-	
SIGNALWEGE	133
6.4.1 <i>Untersuchte Gene der MAPK-Signalweg RT²-Profiler Array Analysen</i>	<i>133</i>
6.4.2 <i>Untersuchte Gene der eNOS-Signalweg mittels Real-Time TaqMan PCR-Array</i> <i>Analysen</i>	<i>135</i>
6.5 LITERATURVERZEICHNIS	138
6.6 LEBENSLAUF	I
6.7 PUBLIKATIONEN	II

1 Einleitung

1.1 Taxonomie der Parvoviren

Die Klassifizierung der Parvoviren beruht auf morphologischen und strukturellen Charakteristika (s. Abb. 1). Allen Spezies dieser Familie ist gemein, dass sie kleine, unbekapselte Viren ikosaedrischer Form sind, die ein einzelsträngiges DNA-Genom aus 4500 bis 5500 Nukleotiden mit terminalen Hairpin-Strukturen besitzen. Die Familie der *Parvoviridae* teilt sich in die zwei Subfamilien der *Densovirinae* und der *Parvovirinae* auf. *Densovirinae* infizieren nur Invertebraten, darunter viele Insekten, wohingegen die *Parvovirinae* für Vertebraten pathogen sind. *Parvovirinae* sind aufgrund ihres Transkriptoms, ihres Replikationsmusters, der Art ihrer *terminal repeats* und der Fähigkeit autonom zu replizieren weiter in fünf Gattungen untergliedert (Kerr 2006). Mitglieder der Gattung Parvovirus sind in der Lage autonom zu replizieren, Dependoviren benötigen hierfür stets die Koinfektion mit Helferviren wie Adeno- oder Herpesviren (Berns und Bohenzky 1987). Erythroviren zeichnen sich dadurch aus, dass sie prädominant in erythroiden Vorläuferzellen replizieren, zu diesen gehört auch das Parvovirus B19 (B19V).



1 Einleitung

Lange Zeit war B19V das einzig bekannte humanpathogene Mitglied der *Parvoviridae*. 2005 wurde das Parvovirus 4 in einem Patienten mit akutem viralem Syndrom entdeckt (Jones et al. 2005). Etwa zur gleichen Zeit fand man ein bis dato unbekanntes DNA-Virus in Lungenproben. Dieses wurde zwei Jahre später als humanes Bocavirus, ein Erreger von Erkrankungen der Atemwege und des Verdauungstrakts, beschrieben (Vicente et al. 2007; Brown 2010). Eine exakte Klassifizierung beider Virenarten steht zum heutigen Zeitpunkt noch aus (King 2012).

1.2 Parvovirus B19

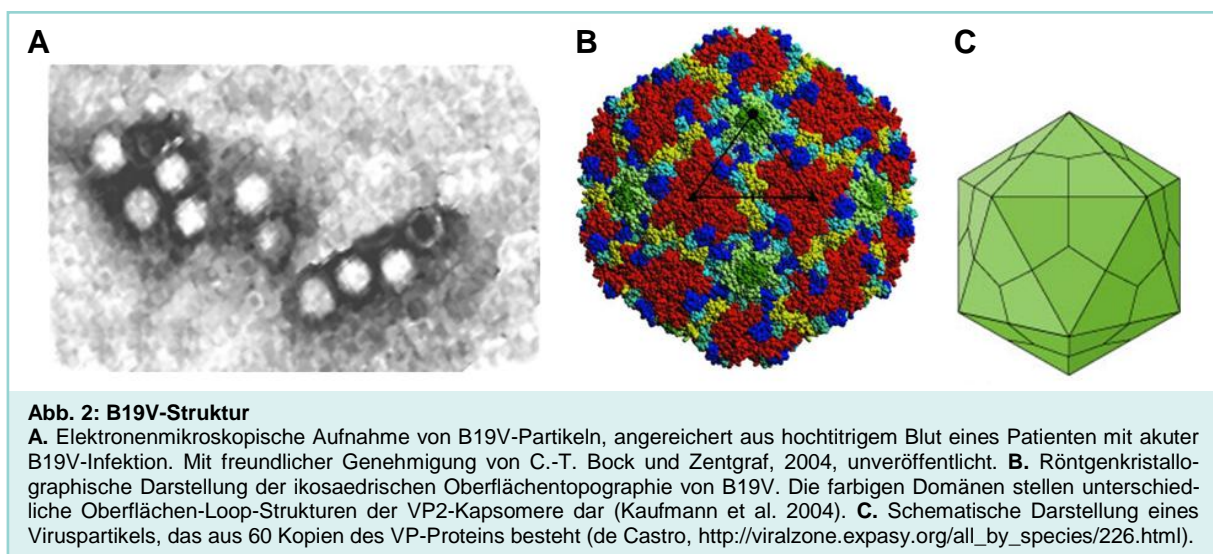
Im Jahr 1974 wurde das Parvovirus B19 (B19V) während einer Routineuntersuchung von Blutproben auf Hepatitis B Virus Infektionen zufällig entdeckt. Die australische Virologin Yvonne Cossart, die damals für das *South London Blood Transfusion Centre* arbeitete, benannte das Virus nach der Position der betreffenden Probe (Reihe B, Platz 19; Cossart et al. 1975). Das Virus ist weltweit verbreitet und die Durchseuchungsrate in der Bevölkerung ist durchweg sehr hoch. Die Prävalenz von Antikörpern gegen B19V (Anti-B19V-IgG) in Deutschland nimmt mit dem Alter zu. 2-10% der Kinder unter 5 Jahren, 40-60% der Personen über 20 Jahre und mehr als 85% der über 70-Jährigen haben eine Infektion durchgemacht (Robert-Koch-Institut 1999). Die B19V-Infektion manifestiert sich klinisch je nach immunologischem Status des Patienten unterschiedlich und reicht vom asymptomatischen Verlauf oder Arthropathien bei gesunden Erwachsenen über Ringelröteln (*Erythema infectiosum*) bei Kindern bis hin zum Abort durch *Hydrops fetalis* bei schwangeren Frauen. Die Diagnose einer akuten Infektion basiert auf der Detektion von viraler DNA im Blut und dem Nachweis von spezifischen Antikörpern gegen virale Proteine. Die Detektion von DNA in Gewebebiopsien ohne Nachweis von B19V im Blut sowie das Vorhandensein von Antikörpern gegen die viralen Strukturproteine im Blut weisen auf eine zurückliegende Infektion hin. Zum heutigen Zeitpunkt ist nur eine symptombezogene Therapie möglich, die Entwicklung eines Impfstoffs gegen B19V steht jedoch aus.

1.2.1 Morphologie

B19V ist ein unbehülltes, einzelsträngiges DNA-Virus. Die Namensgebung, abgeleitet vom lateinischen *parvus* für „klein“ (Berns, Fields et al. 1996, Parvoviridae), wurde durch die geringe Abmessung der Viruspartikel von nur 18 bis 24 nm inspiriert. Die Hülle des B19V-Virions besteht aus einem ikosaedrischen Kapsid, das aus 60 Kapsomeren der beiden viralen Hüllproteine VP2 (95%) und VP1 (5%) gebildet wird. VP1 ist für die Zusammensetzung und Struktur des Kapsids nicht zwingend nötig, es enthält jedoch eine Phospholipase A2

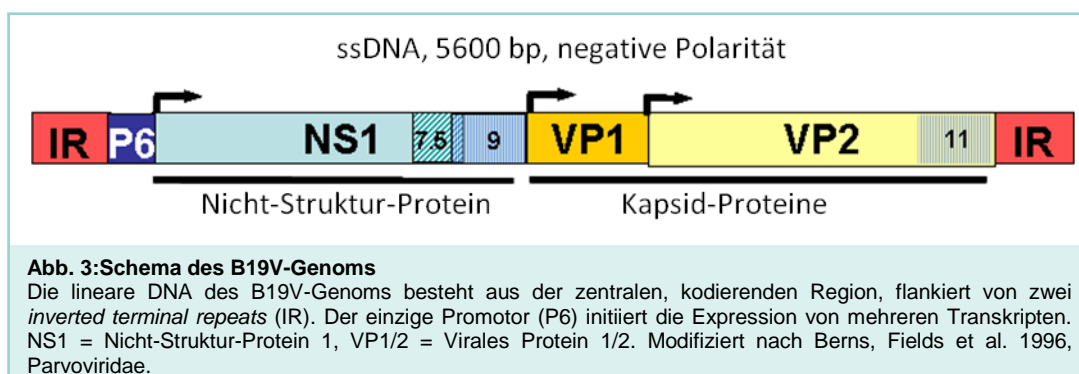
(PLA2)-Domäne und ein nukleäres Lokalisationssignal (NLS), die beide für den Eintritt des Virus in den Nukleus der Wirtszelle entscheidend sind (Dorsch et al. 2002; Zádori et al. 2001; Vihinen-Ranta et al. 2004).

In elektronenmikroskopischen Negativfärbungen von virushaltigem Serum sind sowohl leere als auch mit linearer Virus-DNA gepackte Partikel zu erkennen (s. Abb. 2A; Cossart et al. 1975). Untersuchungen durch Röntgenkristallchromatographie zeigten, dass sich die Oberfläche der B19V-Partikel von denen anderer Parvoviren stark unterscheidet, da ihnen die markanten Glykoprotein-Fibern fehlen (s. Abb. 2B und -C; Agbandje et al. 1994). Da B19V keine Lipidhülle besitzt, ist dieses Virus außerdem extrem resistent gegen physische Inaktivierungen wie Hitze oder Detergenzien (Schwarz et al. 1989).



1.2.2 Struktur des Parvovirus B19-Genoms

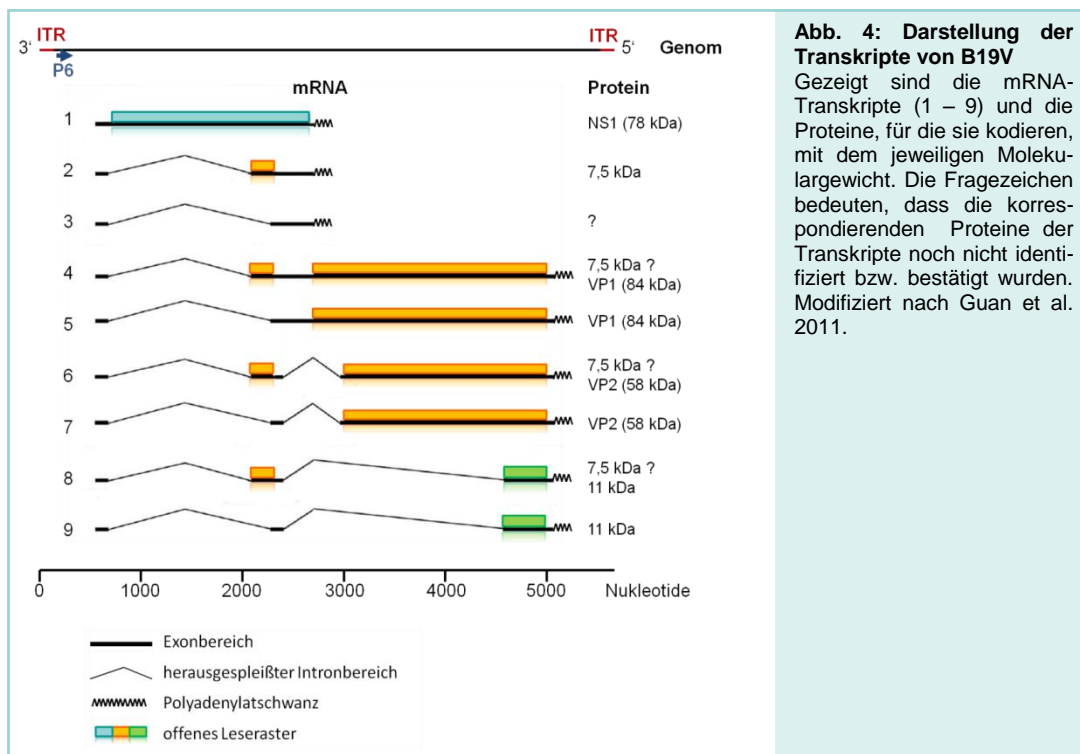
Das einzelsträngige B19V-Genom ist ca. 5600 bp lang und besteht aus einer zentralen kodierenden Region, flankiert von zwei *inverted terminal repeats* mit je 383 bp (Deiss et al. 1990). Diese Sequenzen sind palindromisch aufgebaut und können *Hairpin*-Strukturen ausbilden, die bei der viralen Replikation als Primer für die Synthese des Komplementärstrangs dienen (s. Abb. 3).



1 Einleitung

Das B19V-Genom enthält nur einen einzigen aktiven Promotor, P6, der in der 5'-Palindrom-region lokalisiert ist (Doerig et al. 1987). Dieser Promotor reguliert die Synthese von neun überlappenden mRNA-Transkripten, die durch alternative Spleißmechanismen und die Verwendung verschiedener Polyadenylierungsstellen in der Mitte, also etwa nach 2000bp des kodierenden Bereichs, und am 5'-Ende des Genoms generiert werden (s. Abb. 4; Deiss et al. 1990; Ozawa et al. 1987; Yoto et al. 2006). Der kodierende Bereich des Genoms enthält die Leseraster für die drei Hauptproteine von B19V: das Nicht-Struktur-Protein 1 (NS1) und die zwei Strukturproteine des Kapsids Virales Protein 1 (VP1) und Virales Protein 2 (VP2; Heegaard und Brown 2002; Luo und Astell 1993; Ozawa et al. 1987; Zhi et al. 2006). Die Strukturproteine VP1 und VP2 entstehen durch alternatives Spleißen, wodurch VP1 die gleiche Aminosäure (AS)-Sequenz wie VP2 besitzt, zusätzlich jedoch 226 AS am Amino-Terminus des Proteins (= VP1unique (u)-Region; Shade et al. 1986).

Neben den drei Hauptproteinen werden mehrere kleine Proteine translatiert, die jeweils nach ihrem Molekulargewicht (7,5-, 9- und 11 kDa) benannt sind. Das 11 kDa-Protein kann eine Caspase-10-abhängige Apoptose induzieren (Chen et al. 2010b) und spielt bei der Virusreplikation eine Rolle (Zhi et al. 2006). Über die Funktion der beiden anderen Proteine 7,5 kDa- und 9kDa-Protein ist derweilen wenig bekannt (Brown 2005).



1.2.3 Parvovirus B19-Replikation

Wie bei anderen unbehüllten DNA-Viren beginnt der parvovirale Infektionszyklus mit dem Anheften des Virions an die Oberflächenrezeptoren der Wirtszelle. Als zellulärer Rezeptor dient B19V das Glykosphingolipid Globosid, ebenso beschrieben als Blutgruppen-Antigen P (Brown et al. 1993). Personen mit dem seltenen p-Phänotyp sind natürlicherweise resistent gegenüber B19V-Infektionen (Brown et al. 1994a). Die Anwesenheit des P-Antigens ist notwendig, jedoch nicht hinreichend für die Infektion einer Zelle. Für die Bindung und Internalisierung des Virus wurden sowohl das $\alpha 5 \beta 1$ -Integrin als auch das Autoantigen Ku80 als Korezeptoren identifiziert (Munakata et al. 2005; Weigel-Kelley et al. 2003; Weigel-Kelley et al. 2001).

Nach Internalisierung durch Klathrin- und Dynamin-vermittelte Endozytose werden die Viruspartikel in der nukleären Peripherie entpackt, indem die parvovirale PLA2-Domäne des VP1-Proteins die Vesikelmembran spaltet. Das nukleäre Lokalisationssignal (NLS) befähigt das Kapsidprotein VP1 zur Bindung an zelluläres Importin und dirigiert so die Translokation des viralen Genoms über den Kernporenkomplex in den Nukleus (Brown 2010; Servant-Delmas et al. 2010). Das virale Genom kodiert für keine DNA-Polymerase, daher ist B19V entweder von den Enzymen der Wirtszelle während der S-Phase und somit von der mitotischen Aktivität der Wirtszelle oder von der Koinfektion mit anderen Viren abhängig, um zu replizieren (Brown 2010). Auch die Transkription der B19V-Gene wird durch die zelluläre Transkriptionsmaschinerie vermittelt. Das NS1-Protein wird frühzeitig synthetisiert (Morita und Sugamura 2002) und initiiert die Replikation sowie die Expression der Strukturproteine VP1 und VP2 durch die Bindung an den viralen P6-Promotor (Doerig et al. 1990; Morita und Sugamura 2002). Die Strukturproteine VP1 und -2 bilden das Kapsid für neue Viruspartikel, die nach der Verpackung mit viraler ssDNA (*single strand DNA*) und der Lyse der Wirtszelle freigesetzt werden (s. Abb. 5).

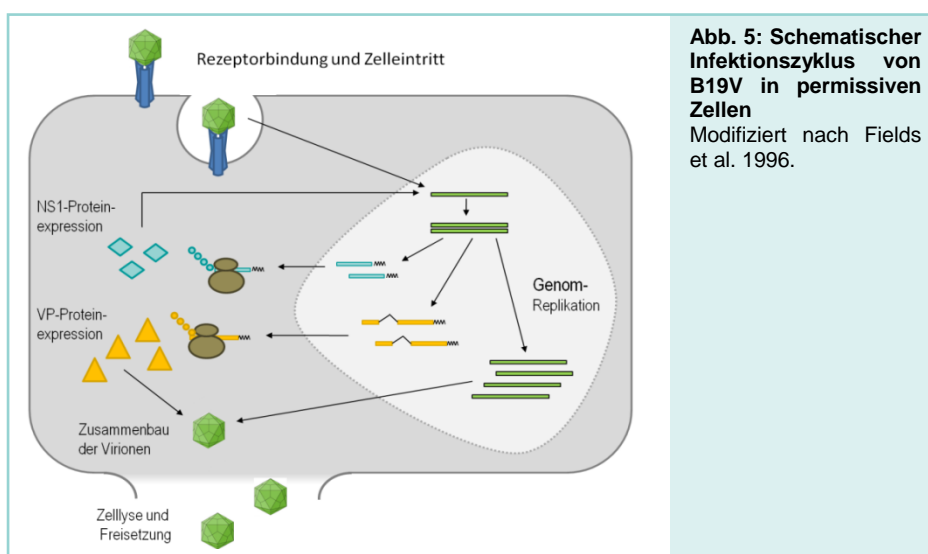
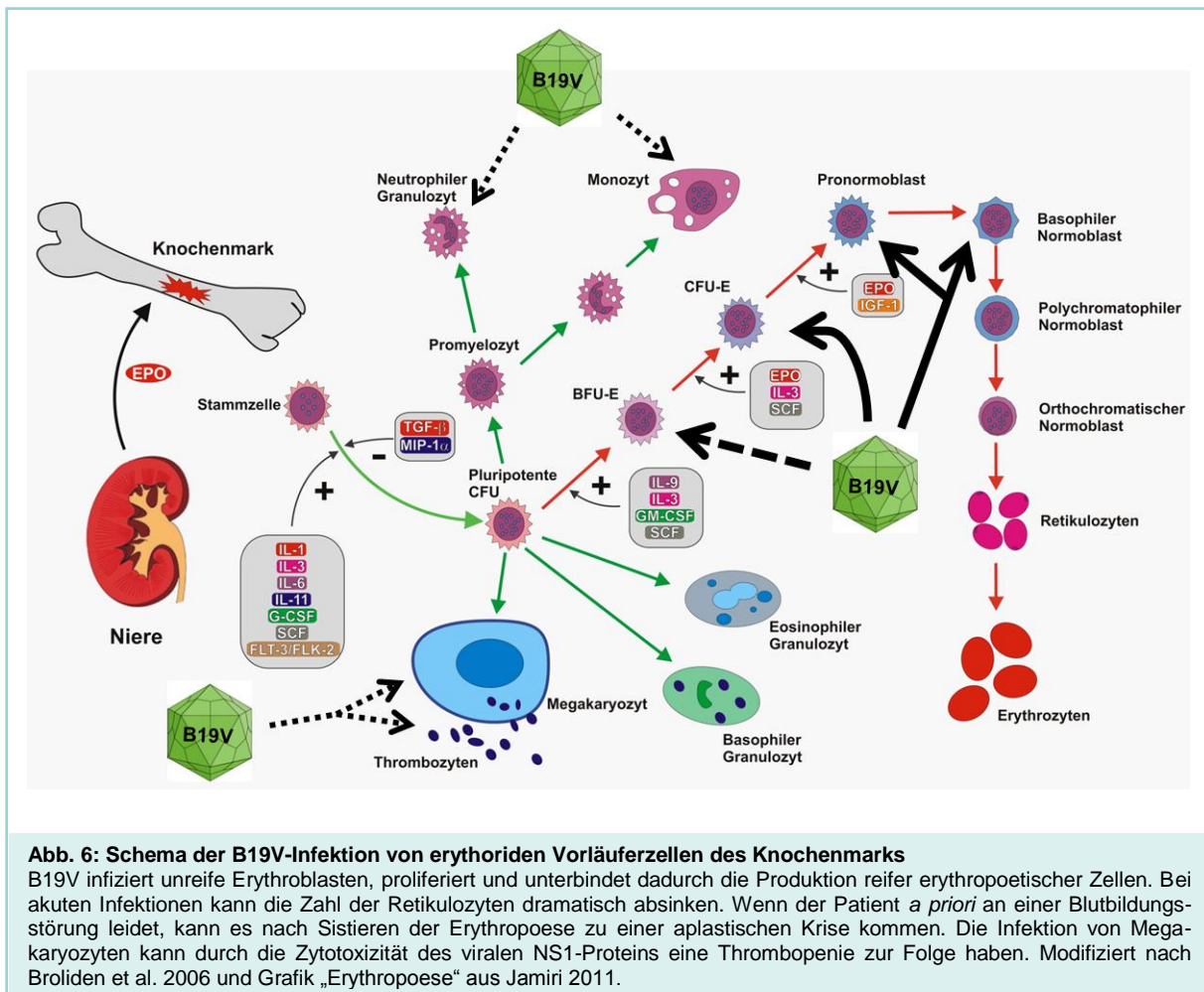


Abb. 5: Schematischer Infektionszyklus von B19V in permissiven Zellen
Modifiziert nach Fields et al. 1996.

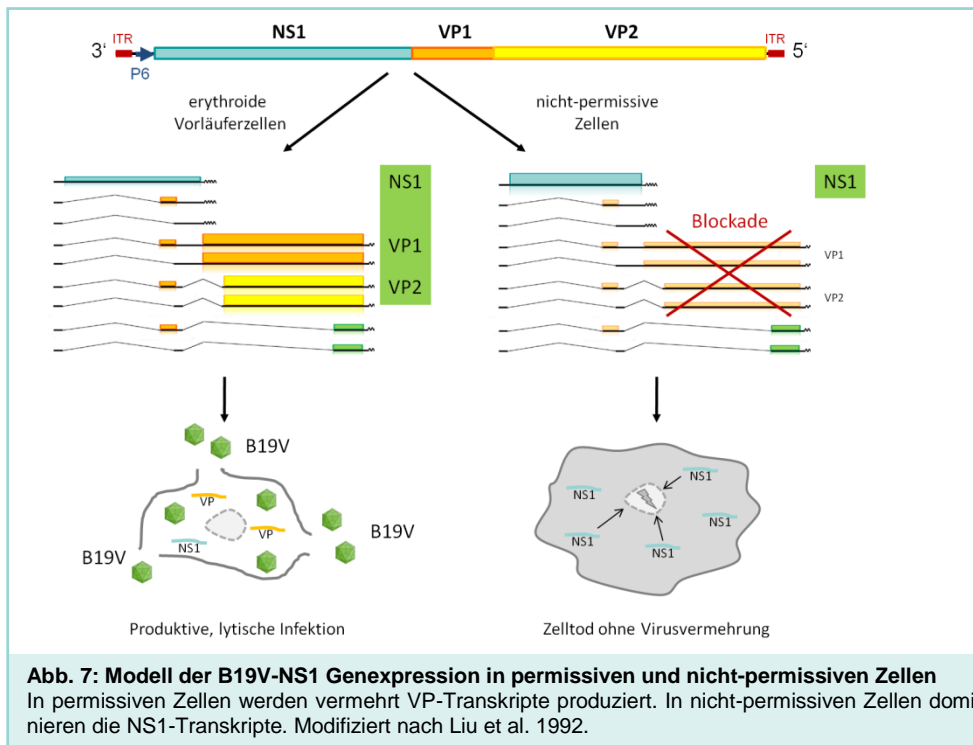
1.2.4 Zelltropismus und Permissivität von Parvovirus B19

Die drei Rezeptoren für B19V, der Hauptrezeptor Blutgruppen-Antigen P und die beiden Korezeptoren $\alpha 5\beta 1$ -Integrin und Ku80, bestimmen dessen strikten Zelltropismus. Obwohl B19V eine Vielzahl an Zellarten wie z.B. Megakaryozyten, Thrombozyten, Erythrozyten und fötale Myozyten infizieren kann, findet die Replikation fast ausschließlich in erythroiden Vorläuferzellen und fötalen Hepatozyten statt (Srivastava und Lu 1988; Brown et al. 1991). Diese Limitierung scheint eng mit der Erythropoietin (EPO)/EPO-Rezeptor-Signalgebung verbunden zu sein. Laut einer Studie von Chen und Kollegen (Chen et al. 2010a) ist EPO notwendig ist, um erythroide Vorläuferzellen sensibel für eine B19V-Infektion zu machen und die B19V-Replikation aufrecht zu erhalten (s. Abb. 6). Dabei ist sowohl die EPO-Konzentration als auch das Vorhandensein des EPO-Rezeptors ausschlaggebend für das Ausmaß der B19V-Replikation (Heegaard und Brown 2002; Takahashi et al. 1990).



Differenzielle Syntheseraten der parvoviralen Proteine scheinen bei der Unterscheidung zwischen permissiven und nicht-permissiven Zellen eine wichtige Rolle zu spielen. In nicht-permissiven Zellen wird die mRNA-Prozessierung des Gesamtlänge-Transkripts blockiert, folglich kann in nicht-permissiven Zellen das zytotoxische NS1-Protein akkumulieren und die

Zelle geht zugrunde, ohne dass eine vollständige Virusvermehrung stattfinden kann. In permissiven Zellen liegt der Schwerpunkt der Expression auf der Seite der Kapsidproteine, was die Bildung neuer Viruspartikel und somit eine produktive, lytische Infektion ermöglicht (s. Abb. 7; Liu et al. 1992). Dieser Prozess wird vermutlich durch alternatives Spleißen und die Verwendung verschiedener Polyadenylierungsstellen (Yoto et al. 2006; Guan et al. 2008), Blockierung der Assoziation von VP-Transkripten mit den Ribosomen (Pallier et al. 1997) oder die Funktion des 11 kDa-Proteins (Zhi et al. 2006) beeinflusst.



Zudem kann die Infektion permissiver Wirtszellen mit B19V nicht nur zu einer lytischen Infektion führen, in der das Virus repliziert, sondern auch als latente Form verlaufen. Andere DNA-Viren haben hierbei die Fähigkeit in das Wirtsgenom zu integrieren oder ihr Genom als episomales Minichromosom aufrecht zu erhalten. Dieser Vorgang der Stilllegung des Virus ist mit einer ausgedehnten CpG-Methylierung der viralen DNA häufig assoziiert (Hoelzer et al. 2008). Auch bei B19V gibt es erste Hinweise, dass epigenetische Modifikationen die Expression der viralen Gene und somit den Verlauf und die Persistenz einer natürlichen Infektion beeinflussen (Bonvicini et al. 2012).

1.3 Pathogenität des Parvovirus B19

1.3.1 Parvovirus B19-assoziierte Krankheiten

Die Übertragung des weltweit verbreiteten B19V erfolgt horizontal über den Respirationstrakt bei engem persönlichen Kontakt (Robert-Koch-Institut 1999) oder in seltenen Fällen auch über kontaminierte Blutkonserven und transplantierte Organe (Tsukada et al. 2011). Ebenso findet eine vertikale Transmission von Mutter zu Kind statt. Die Inkubationszeit schwankt zwischen 4 und 14 Tagen. Personen sind abnehmend ansteckend, sobald die ersten Symptome auftauchen, da die Virämiephase zu diesem Zeitpunkt abgeschlossen ist. Die virale Infektion manifestiert sich je nach Alter sowie immunologischem und hämatologischem Status des Patienten (Heegaard und Brown 2002).



In gesunden, immunkompetenten Kindern verursacht B19V Ringelröteln (*Erythema infectiosum*, *fifth disease*), einen harmlosen Hautausschlag in Ringelstruktur mit einer charakteristischen „slapped-cheek“-Rötung des Gesichts (Schmetterlingserythem; Anderson et al. 1985; Naides 1999). Bei Erwachsenen verläuft die Infektion in etwa 25 % der Fälle asymptomatisch oder mit milden, unspezifischen Symptomen, die denen einer Erkältung ähneln können (Woolf et al. 1989). Gelegentlich ist die Infektion aber mit einer akuten Polyarthropathie verbunden, die einer rheumatoiden Arthritis ähnelt. Wegen des Tropismus des B19V für erythroide Vorläuferzellen, verursacht eine Infektion bei Personen mit

chronischer hämolytischer Anämie eine transiente oder chronische aplastische Krise, bei der das Knochenmark vorübergehend keine Erythrozyten mehr bildet. In immunsupprimierten Patienten kann sich eine persistente Infektion als chronische Anämie manifestieren. Eine Infektion bei Schwangeren kann, auch wenn diese ohne Symptome verläuft, durch die transplazentare Übertragung des Virus aufgrund des unausgereiften Immunsystems des Fötus zur Entwicklung einer angeborenen Anämie, einer fötalen Myokarditis oder zum Tod *in utero* (*Hydrops fetalis*) führen (Brkic et al. 2011). Weitere neu identifizierte Krankheitsbilder, die mit einer B19V-Infektion assoziiert werden können, sind z.B. das *Red Baby Syndrom* (Sasidharan et al. 2009) oder der systemische *Lupus erythematosus* (Aslanidis et al. 2008).

Tabelle 1: Erkrankungen, die in Zusammenhang mit einer B19V-Infektionen auftreten

Modrow 2006. Erweitert um ¹Aslanidis et al. 2008; ²Sasidharan et al. 2009; ³Skaff und Labiner 2001; ⁴Bock et al. 2005; ⁵Rodis et al. 1998. chr. = chronisch

Immunkompetente Personen		Immunsupprimierte Personen
häufig	selten	ungeborene Kinder
asymptomatisch	Thrombopenie	Spontanabort
unspezifische Symptome	Granulozytopenie	<i>Hydrops fetalis</i>
<i>Erythema infectiosum</i>	Purpura Schönlein-Henoch	intrauteriner Kindstod
transiente Anämie	chr. Arthritis	angeborene Anämie ⁵
transiente Arthritis	Sklerodermie	Myokarditis ⁵
transiente Arthralgie	<i>Papular purpuric gloves and socks syndrome</i> (PPGSS)	bei hämatologischen Grunderkrankungen
	Panzytopenie	schwere Anämie
	Virus-ass. hämophagozytäres Syndrom	aplastische Krise
	akutes Leberversagen/ Hepatitis	häufig
	Pseudoappendizitis	chr. Anämie
	mesenteriale Lymphadenitis	Erythroblastopenie (<i>pure red cell aplasia</i>)
	Myositis	chr. Thrombozytopenie
	Myokarditis	chr. Granulozytopenie
	Glomerulonephritis	chr. Panzytopenie
	Meningitis	Myokarditis/Perikarditis/akutes Herzversagen
	Enzephalitis	akutes Leberversagen/Hepatitis
	zerebelläre Ataxie	Meningitis/ Enzephalitis
	Gullian-Barré-Syndrom	
	<i>systemischer Lupus erythematosus</i> ¹	
	<i>Red Baby Syndrom</i> ²	
	Epilepsie ³	
	inflammatorische Kardiomyopathie ⁴	

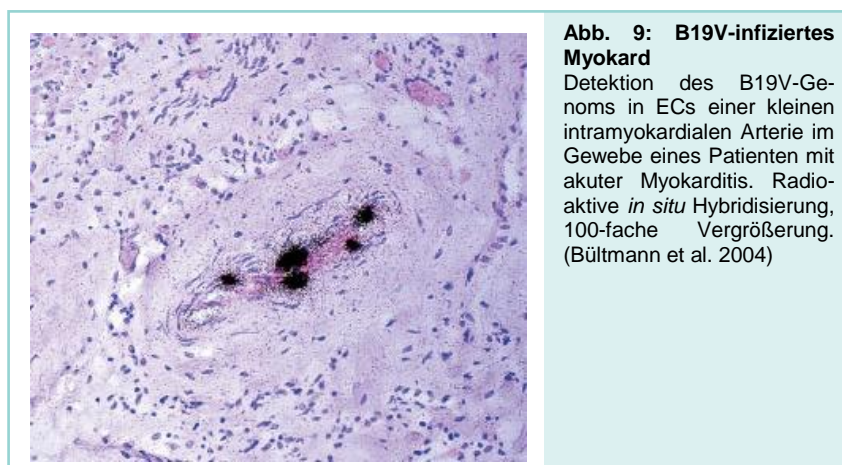
Sobald das Immunsystem die B19V-Infektion eliminiert hat, erbringt dies in den meisten Fällen einen lebenslangen Schutz gegen B19V. In seltenen Fällen ist eine primäre B19V-Doppelinfection oder erneute Infektion möglich, was dazu führen kann, dass verschiedene Genotypen von B19V im Gewebe eines einzigen Individuums nachgewiesen werden können (Schneider et al. 2008). In immunkompetenten Patienten mit oder ohne Symptomatik kann

1 Einleitung

das Virus latent im Knochenmark verbleiben (Cassinotti et al. 1997; Lundqvist et al. 1999; Nikkari et al. 1995). So werden im Blut von solchen Personen Jahre nach der Erstinfektion B19V-Genome nachgewiesen (Cassinotti und Siegl 2000; Lefrère et al. 2005; Servant-Delmas et al. 2010). Die Diagnose des Virus basiert hauptsächlich auf der Detektion von spezifischen Antikörpern mittels ELISA (*Enzym-linked immunosorbent assay*) oder dem Nachweis viraler DNA aus Blut oder Gewebebiopsien durch PCR (*Polymerase chain reaction*; Heegaard und Brown 2002).

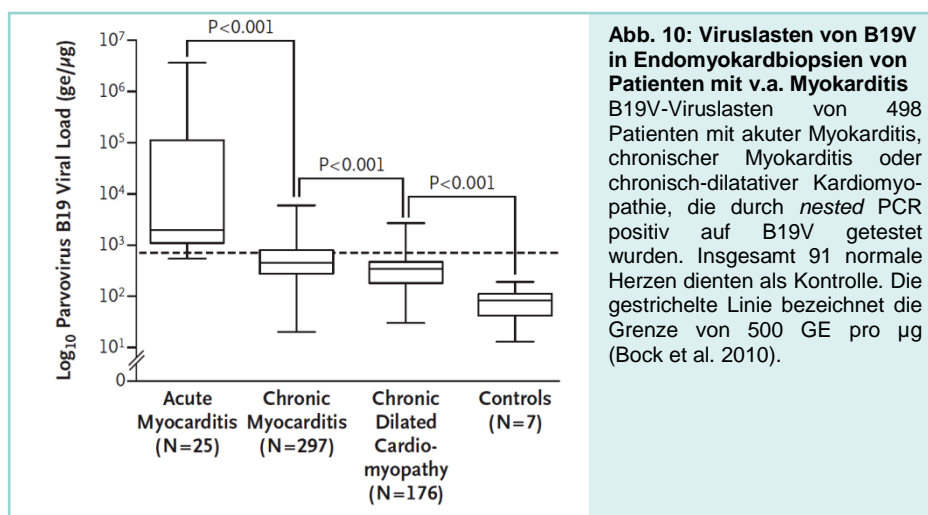
1.3.1.1 Parvovirus-assoziierte Myokarditis

In den 90er Jahren wurden erstmals vereinzelte Fälle von klinisch signifikanter Myokarditis bei Kindern (Borreda et al. 1992; Enders et al. 1998) und Erwachsenen (Chia und Jackson 1996; Heegaard et al. 1998; Tsuda et al. 1994) im Zusammenhang mit B19V beschrieben. Erst mehrere Jahre später trugen diese Daten dazu bei, die ätiopathogenetische Rolle der B19V-Infektion in der Entstehung von schweren kardialen Dysfunktionen zu bestätigen. So wurden durch hochsensitive PCR-Methoden B19V-spezifische Nukleinsäuren in Endomyokardbiopsien von Patienten mit dilatativer Kardiomyopathie nachgewiesen und durch radioaktive *in situ* Hybridisierung parvovirale Genome direkt in den Endothelzellen (ECs) des Myokards detektiert (Bültmann et al. 2003; Kandolf 2004; Klingel et al. 2004). Bei Patienten mit akuter inflammatorischer Kardiomyopathie (iCMP) waren insbesondere venöse Teile des Koronarsystems sowie kleine Arterien und Arteriolen, nicht aber die kardialen Myozyten selbst von der Parvovirus B19-Infektion betroffen (s. Abb. 9).



Die B19V-infizierten intrakardialen ECs wiesen zudem eine deutlich gesteigerte Expression des Adhäsionsmoleküls E-Selektin auf, was mit der Margination, Adhärenz, Penetration und perivaskulären Infiltration durch aktivierte Makrophagen und T-Lymphozyten einherging. Durch diese Vorgänge, die durch eine B19V-Infektion ausgelöst werden können, kann die

koronare Mikrozirkulation in den kardialen ECs gestört werden, was sekundär zu Schädigungen der Myozyten führen kann (Bock et al. 2005; Bültmann et al. 2003; Kandolf 2004). Im Gegensatz zur akuten B19V-assoziierten iCMP finden sich bei der chronisch dilatativen Kardiomyopathie (CMP) virale Genome im Bereich des Endothels der engmaschigen Kapillaren des Myokards, verbunden mit einer chronischen, makrophagenreichen Inflammation (Klingel et al. 2004). Ebenso unterschied sich bei iCMP und CMP die Viruslast, die mittels fluoreszenzgestützter quantitativer PCR in Endomyokardbiopsien nachweisbar war. Diese lag bei akuter Infektion des Herzens bei durchschnittlich 316000 Genom-äquivalenten (GE) pro μg isolierter Nukleinsäure. Bei chronischer Myokarditis waren etwa 700 GE/ μg und bei chronisch-dilatativen Kardiomyopathie knapp 400 GE/ μg nachweisbar. Nicht entzündete Kontrollherzen wiesen eine durchschnittliche Anzahl von 80 GE/ μg auf. Diese Daten lassen einen Schwellenwert von etwa 500 GE/ μg erkennen, der nötig scheint um eine Myokardinfektion aufrecht zu erhalten (s. Abb. 10; Bock et al. 2010). Seit kurzem wird deutlich, dass einer entzündlichen Herzmuskelerkrankung häufig eine B19V-Infektion oder -Reaktivierung zugrunde liegt (Pankuweit und Maisch 2010).



In Autopsie-Befunden wurde beobachtet, dass B19V häufig bei Patienten ohne Herzerkrankungen im Herzen nachweisbar ist (Schenk et al. 2009) oder subimmunologisch im Gewebe persistiert (Corcioli et al. 2008). Es ist daher nach wie vor unklar, welche Ursachen die Entwicklung einer viralen Herzerkrankung nach B19V-Infektion zugrunde liegen. Die im Rahmen der Diagnostik routinemäßig durchgeführte Mutationsanalyse der B19V-Genome gibt Grund zu Annahme, dass unterschiedliche Genotypen und Virusvarianten das Auftreten und die variablen Verlaufsformen der myokardialen Erkrankungen erklären können (Bock et al. 2005; Kandolf et al. 2008). Als eine weitere Ursache wird der genetische Hintergrund des Patienten in Betracht gezogen, der zu unterschiedlichen Immunreaktionen auf die virale Infektion führen kann (Dennert et al. 2008). Außerdem findet sich in über 40 % der Gesamtinfektionen bei Patienten mit kardialer Dysfunktion bei klinisch vermuteter Myokarditis und

1 Einleitung

dilatativer Kardiomyopathie zusätzlich zur vorliegenden B19V-Infektion eine Koinfektion mit anderen Viren wie z.B. HHV6 und EBV (Duechting 2008; Kandolf et al. 2008). Virale Interferenzen können hier zur Aktivierung der Genexpression eines latent vorliegenden B19V führen (Pozzuto et al. 2011).

1.3.1.2 Endotheliale Dysfunktion

Neben den akuten und chronischen Formen einer inflammatorischen Kardiomyopathie wurde B19V ebenso mit einer isolierten endothelialen und diastolische Dysfunktion assoziiert. Als endotheliale Dysfunktion (ED) wird eine Funktionsstörung des Endothels bezeichnet, die alle Funktionsbereiche des Endothels, die Gefäßweitenregulation, die Gefäßpermeabilität, die Modulation der adhäsiven Eigenschaften und die Thrombozytenaggregationshemmung umfasst. Das Vorhandensein viraler Genome in Endomyokardbiopsien mit ED geben Grund zur Annahme, dass B19V dadurch mit dem Pathomechanismus der diastolischen Dysfunktion assoziiert ist (Tschöpe et al. 2005). Wie bereits erwähnt zeigten immunhistochemische Beobachtungen in ECs von B19V-infizierten Herzen eine gesteigerte Expression von Zytokinen und Adhäsionsmolekülen (s. Abb. 11; Bültmann et al. 2004). Dies kann zur ausgeprägten intravaskulären Akkumulation, Adhäsion und Penetration von T-Lymphozyten und aktivierten Makrophagen führen, die das umgebende Myokard infiltrieren (s. Abb. 11; Bültmann et al. 2004; Kandolf 2004). Der Zusammenbruch der endothelialen Barrierefunktion mit Verlust der Selektivpermeabilität des Endothels verursacht eine Ödembildung, welche im Myokard zur massiven Beeinträchtigung der Organfunktion führt. Die Infektion intrakardialer Endothelien führt wahrscheinlich konsekutiv zu ED, Mikrozirkulationsstörungen und sekundärer (reaktiver) Schädigung von Myozyten und daher zu kardialer Dysfunktion (Kandolf et al. 2008).

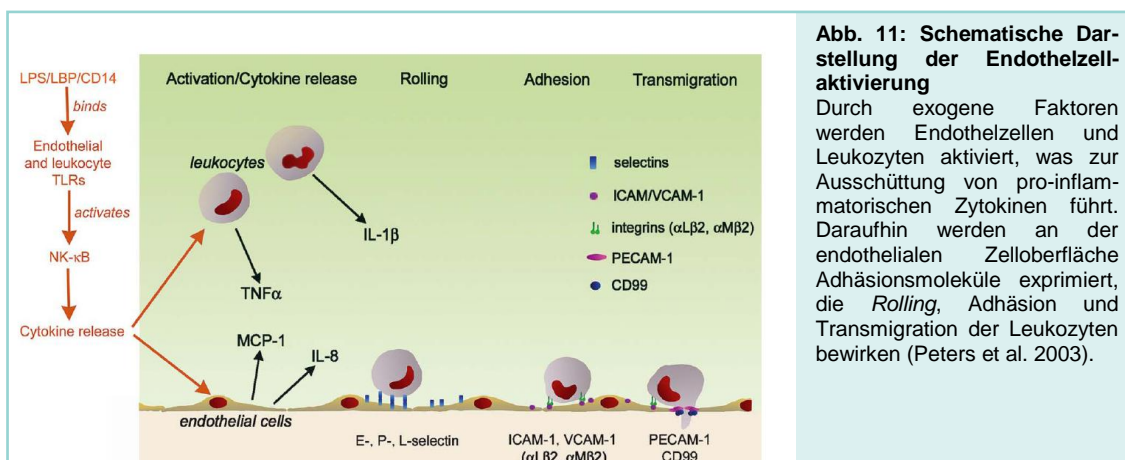


Abb. 11: Schematische Darstellung der Endothelzellaktivierung

Durch exogene Faktoren werden Endothelzellen und Leukozyten aktiviert, was zur Ausschüttung von pro-inflammatorischen Zytokinen führt. Daraufhin werden an der endothelialen Zelloberfläche Adhäsionsmoleküle exprimiert, die *Rolling*, Adhäsion und Transmigration der Leukozyten bewirken (Peters et al. 2003).

1.4 Genomdiversität von Parvovirus B19

1.4.1 Genetische Varianz

Lange Zeit wurde angenommen, dass die Sequenzvarianz von B19V sehr gering ist und im gesamten Genom weniger als 1 - 2 % beträgt (Erdman et al. 1996, Hemauer et al. 1996). Mit zunehmender Zahl an isolierten B19V-Spezies aus unterschiedlichen endemischen Regionen stellte sich jedoch heraus, dass B19V eine Mutationsrate besitzt, die untypisch hoch für ein DNA-Virus ist (Cotmore et al. 1986; Rinckel et al. 2009) und eher der von RNA-Viren gleicht (Norja et al. 2008). Die relativ hohe parvovirale Mutationsrate von $1,8 \times 10^{-3}$ Substitutionen pro Nukleotid pro Jahr ist ein paradoxes Phänomen. Sie sollte eigentlich entsprechend der von humaner DNA (2×10^{-9} Substitutionen pro Nukleotid pro Jahr) sehr niedrig sein, da parvovirale DNA während der Replikation mit der gleichen zellulären Polymerase wie humane DNA synthetisiert wird. Mögliche Gründe für diese Diskrepanz könnten die vielfache DNA-Prozessierung in Form von unidirektionaler DNA-Synthese während der *Rolling Hairpin* Replikation, die Zerlegung in Einzelstränge und die Synthese von genomischer ssDNA für die Verpackung in Virionen sein, die vermutlich eine erhöhte Fehlerrate im Vergleich zur bidirektionalen Synthese der Wirts-DNA verursachen (Norja et al. 2008). Neben einer solchen schrittweisen Veränderung des Genoms durch Anhäufung von Punktmutationen findet statistisch gesehen alle 10 Jahre zudem ein dynamischer DNA-Strang austausch statt (Suzuki et al. 2009), der zu einem genetischen Drift bei B19V führt.

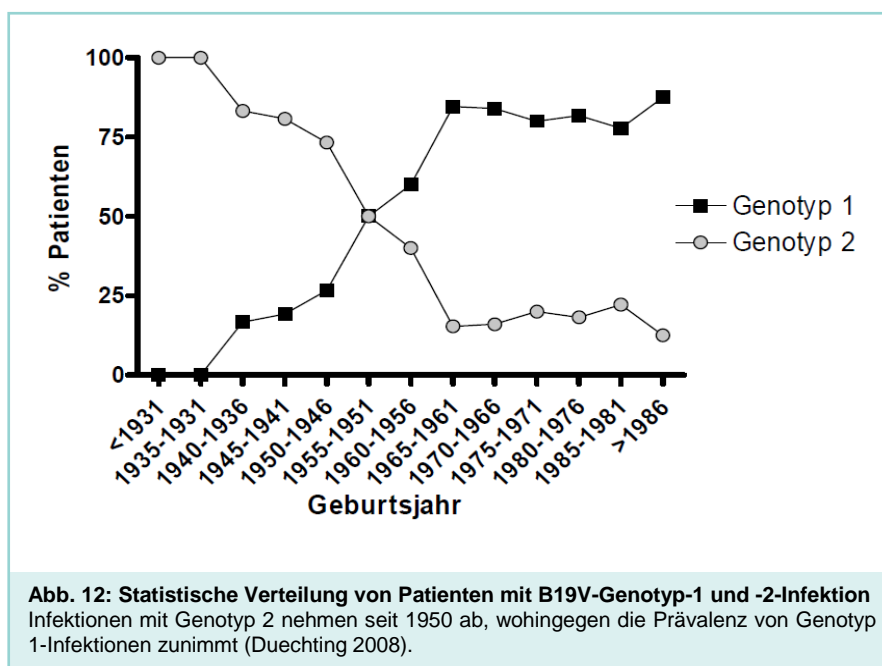
Durch diese Varianz kann B19V in drei Genotypen unterteilt werden, die sich in ihrer Nukleotidsequenz um circa 12 bis 14 % voneinander unterscheiden (Nguyen et al. 2002). Eine Sequenzvarianz von mindestens 8 % separiert die Genotypen voneinander, wohingegen die Abweichung innerhalb einer Genotyp-Familie nicht mehr als 2 % betragen darf (Servant et al. 2002). Zur Klassifizierung der Genotypen von B19V wurden Standardsequenzen festgelegt, die die Genotypen 1 bis 3 charakterisieren. Genotyp 1 wird dargestellt durch den Prototyp Au (Genbank M13178), Genotyp 2 durch die Prototypen haAM (AY044267) und LaLi (AY044266) und Genotyp 3 durch die Prototypen V9 (AY345134) und D91.1 (AY083234).

Die B19V-Genotypen sind in verschiedenen Ländern weitestgehend endemisch. So existieren Genotyp 1 und 2 hauptsächlich in Europa, den USA und anderen westlichen Ländern. B19V Genotyp 3 ist hauptsächlich auf Afrika und Südamerika begrenzt (Norja et al. 2008; Sanabani et al. 2006). In letzter Zeit wurde aber bereits über Fälle von B19V-Infektionen mit Genotyp 3 in den USA (Rinckel et al. 2009) und die Verbreitung aller drei Genotypen in Südafrika berichtet (Corcoran et al. 2010). Allen Genotypen gemeinsam ist jedoch, dass die B19V-Genome von Land zu Land deutlich stärker variieren als über die Zeit (Erdman et al.

1996). Dennoch gibt es bereits Unterschiede in der Genotyp-Prävalenz, wenn die Probenahme nur fünf bis sechs Jahre auseinanderliegt (Umene und Nunoue 1990).

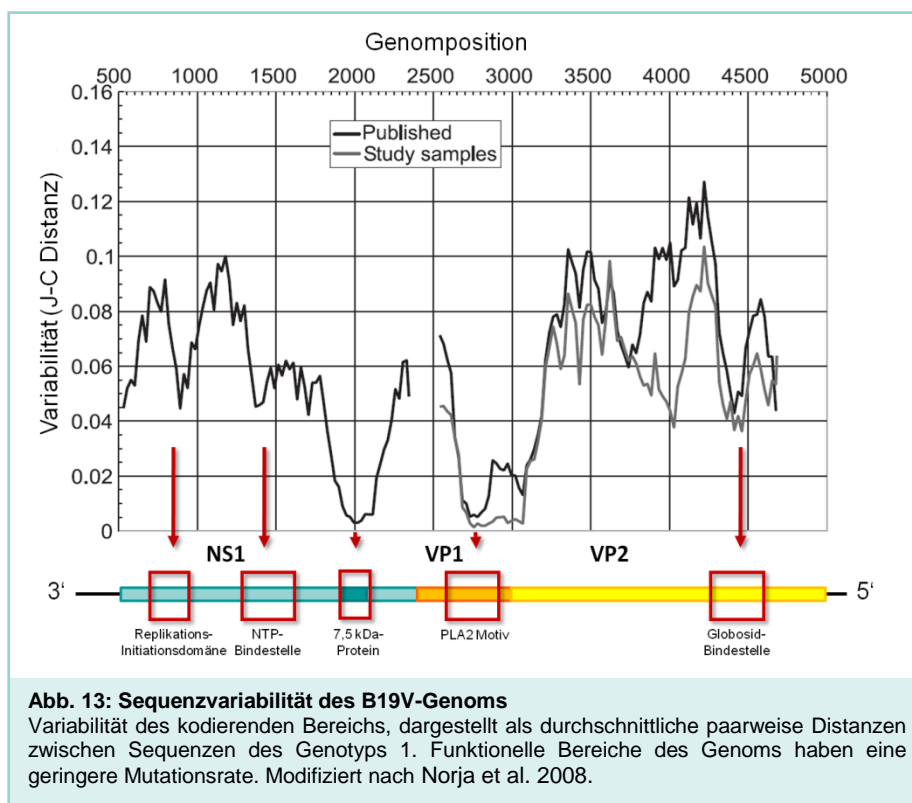
1.4.2 Unterteilung in B19V-Subtypen

In neueren Untersuchungen schreiten die Typisierungen fort, da B19V genetisch weiter divergiert (Chen et al. 2009b). Innerhalb der B19V-Genotypen werden teilweise einzelne Subtypen definiert, die sich durch 5 % Divergenz auf DNA-Ebene von den Prototyp-Sequenzen unterscheiden (Parsyan et al. 2007; Toan et al. 2006a). So wurden für Genotyp 1 bisher mindestens drei Subtypen klassifiziert (Toan et al. 2006a; Corcoran et al. 2010). Genotyp 3 ist unter den Genotypen der evolutionär älteste und spaltete sich nach Kalkulationen der „molekularen Uhr-Hypothese“ (BEAST-Methode, Simmonds 2001) vor ca. 525 Jahren in die zwei Subtypen a und b (Parsyan et al. 2007). In der Fachliteratur existieren bisher noch keine Anhaltspunkte dafür, dass sich Genotyp 2 ebenfalls in Subtypen gliedert. Im Gegensatz zu den beiden anderen Genotypen weist Genotyp 2 jedoch eine altersspezifische Verteilung auf und wurde hauptsächlich in Gewebeproben von Patienten gefunden, die vor 1950 geboren wurden (s. Abb. 12; Duechting 2008). Es wird daher vermutet, dass es sich hierbei um eine „Urform“ des Virus handelt, der momentan im Begriff ist von Genotyp 1 ersetzt zu werden (Corcoran et al. 2010; Norja et al. 2006). Mögliche biologische oder epidemiologische Faktoren für diesen geographisch großflächigen Populationswechsel innerhalb einer so kurzen Periode werden derzeit diskutiert.



1.4.3 Mutationen im Parvovirus B19-Genom

Sequenzvariabilität im kodierenden Teil des parvoviralen Genoms tritt in bestimmten Bereichen auf (s. Abb. 13; Erdman et al. 1996; Norja et al. 2008). DNA-Abschnitte, die für funktionelle Bereiche der Proteine B19V-NS1 und -VP1/2 kodieren sind unabhängig vom Genotyp hoch konserviert (Servant-Delmas et al. 2009). Es finden sich beispielsweise nur sehr wenige oder gar keine Mutationen im Replikations-Initiator-Motiv mit Nukleaseaktivität, der NTP-Binde- und Helikasedomäne von NS1 sowie der PLA2-Domäne in der VP1u-Region (Toan et al. 2006a). Mutations-Häufungen konzentrieren sich auf zwischenliegende DNA-Abschnitte, wie z.B. die hypervariable Region im C-Terminus von B19V-NS1 (Fukada et al. 2000; Kivovich et al. 2012).



Neben Bereichen unterschiedlicher Variabilität entlang des viralen DNA-Strangs sind auch abhängig vom Ursprung des isolierten Virus Unterschiede in der Mutationsrate auszumachen. Proben aus persistenten Infektionen weisen eine dreifach geringere Mutationsrate auf als solche aus akuten Infektionen (Hemauer et al. 1996; Norja et al. 2008). Dies ist vermutlich durch die unterdrückte Replikation während der Persistenz des B19V bedingt (Norja et al. 2008).

1.4.4 B19V-Varianten und assoziierte Krankheiten

Von anderen Viren wie dem Hepatitis C Virus ist bekannt, dass unterschiedliche Genotypen verschiedene Krankheitsverläufe einer Infektion verursachen können. So werden auf molekularer Ebene Signalwege in verschiedenem Ausmaß Genotyp-spezifisch dysreguliert, was zu unterschiedlichen pathologischen Effekten führt, die wiederum eine differenzielle, dem Genotyp angepasste Therapie erfordern (Ripoli und Paziienza 2011). Ob genetische Varianten von B19V zu variablen Ausprägungen einer B19V-assoziierten Krankheit führen, wird gegenwärtig diskutiert. Einige Arbeitsgruppen konnten keinen spezifischen Zusammenhang zwischen klinischen Charakteristika und Nukleotid- bzw. Aminosäuresequenzen feststellen (Gallinella et al. 2003; Suzuki et al. 2009). In anderen Studien wurde dagegen ein Einfluss der B19V-Genotypen auf die Viruslast (Chen et al. 2009b, Duechting 2008) festgestellt oder auch ein Genotyp-2-spezifischer Aminosäure-Austausch mit verringerter Zytotoxizität und somit mit einem unterschiedlichen Verlauf einer Erkrankung der Leber assoziiert (Kivovich et al. 2010).

Auch eine vorangegangene retrospektive Studie in der Abteilung für Molekulare Pathologie in Tübingen (Duechting 2008) zeigte einen Zusammenhang zwischen verschiedenen B19V-Genotypen und damit verbundenen klinischen Formen der Kardiomyopathie. Patienten mit Genotyp B19V-2 wiesen signifikant häufiger die inflammatorische Form der Kardiomyopathie (iCMP) auf als solche mit Genotyp B19V-1-Infektion. In Korrelation dazu wiesen Patienten mit iCMP eine signifikant höhere Viruslast von durchschnittlich 734 (± 82) GE/ μ g im Vergleich zu Patienten mit Kardiomyopathie ohne Entzündungsreaktion mit 540 (± 52) GE/ μ g auf. Somit könnte die Infektion mit unterschiedlichen B19V-Genotypen mit der Entwicklung verschiedener Manifestationen einer Kardiomyopathie in Zusammenhang stehen (Duechting 2008).

Eine weitere Veröffentlichung zeigte ebenfalls einen Genotyp-spezifischen Effekt von B19V-Infektionen auf den Krankheitsverlauf einer CMP. In dieser Studie waren Patienten mit B19V-1-Infektion im Vergleich zu denen mit B19V-2-Infektion durchschnittlich jünger und wiesen im *Follow-up* nach 8 Monaten im Gegensatz zu Patienten mit B19V-2-Infektion eine signifikant verbesserte durchschnittliche linksventrikuläre Ejektionsfraktion ($11 \pm 14,4\%$) auf (Ruppert et al. 2011). Patienten hatten somit eine schlechtere Prognose für den Krankheitsverlauf einer CMP, wenn sie mit B19V-Genotyp 2 infiziert waren.

In der Fachliteratur gibt es kontroverse Berichte darüber, ob die Viruslast bei B19V-Genotyp 1 oder - 2 höher ist. Im Gegensatz zu den Erkenntnissen von Duechting und Kollegen (Duechting 2008) wurden Genotyp-2-Infektionen auch mit geringerer Viruslast als Genotyp-1-Infektionen in Verbindung gebracht (Servant et al. 2002; Chen et al. 2009b). In einer Studie von Chen und Kollegen konnte gezeigt werden, dass die Genotyp-2-Variante A6 eine verminderte Replikationsfähigkeit aufweist (Chen et al. 2009b).

Diese Beispiele verdeutlichen, dass der virale Genotyp von B19V klinische Konsequenzen haben kann. Dieser Befund könnte zukünftig dabei helfen, Patienten gemäß der Genotyp-spezifischen Prognose zu behandeln. Die genaue Charakterisierung von viralen Varianten ist somit wichtig um einen Zusammenhang zwischen B19V und assoziierten Krankheitsbildern herzustellen.

1.5 Das Nicht-Struktur-Protein NS1 von B19V

Der 5'-Bereich des parvoviralen Genoms kodiert für NS1, das einzige Nicht-Struktur-Protein, dessen mRNA-Transkript im Gegensatz zu den beiden Hüllproteinen VP1 und VP2 ungespleißt bleibt. B19V-NS1 besitzt ein Molekulargewicht von 77 kDa und wird vermutlich post-translational durch Phosphorylierungen an Serin/Threonin-Aminosäuren modifiziert (Kawase 1995). Innerhalb einer infizierten Wirtszelle pendelt B19V-NS1 zwischen Zellplasma und Nukleus, häuft sich fokal im Nukleus an und wird dort schließlich durch transiente Interaktionen mit nukleären Kompartimenten homogen verteilt (Ihalainen et al. 2007; Ozawa und Young 1987). Die NS-Proteine sind innerhalb der *Parvoviridae* hoch konserviert und haben eine Vielzahl von Funktionen. So vermitteln sie vor allem die Transkription viraler Gene, die Genomreplikation, die Verpackung in Kapside und den Austritt aus der Wirtszelle (Nüesch 2006).

1.5.1 Aufbau und Funktionen

B19V-NS1 wirkt durch Bindung an virale und zelluläre Promotoren als starker transkriptioneller Aktivator, indem er eine Vielzahl zellulärer Transkriptionsfaktoren rekrutiert (Fu et al. 2002; Raab et al. 2002; Vassias et al. 1998) und ist mit seinen Helikase-, Nickase- und Endonuklease-Eigenschaften bei der viralen Replikation beteiligt.

Diese Effekte werden durch multifunktionelle Domänen bewirkt, die eine konservierte Struktur besitzen. Der Amino-Terminus dieses 672 AS langen Proteins enthält eine Replikations-Initiationsdomäne (AS 3 - 178) mit DNA-Binde- und Endonuklease-Eigenschaften (Nüesch et al. 1995; Yoon et al. 2001; Hickman et al. 2004; Sukhumsirichart 2006). Die Funktion dieser Domäne umfasst vermutlich die Bindung an intermediäre Konkatamer-Strukturen und deren Trennung während der viralen Replikation (Poole et al. 2011; Kivovich et al. 2012). Die enzymatische Aktivität dieses Bereichs wird durch eine Metallkoordinations-Domäne (AS 81 - 85) mit aktiver Tyrosin-Stelle (AS 141) ermöglicht, die einem äquivalenten Motiv in vielen anderen nicht human-pathogenen Parvoviren entspricht (Kivovich et al. 2012).

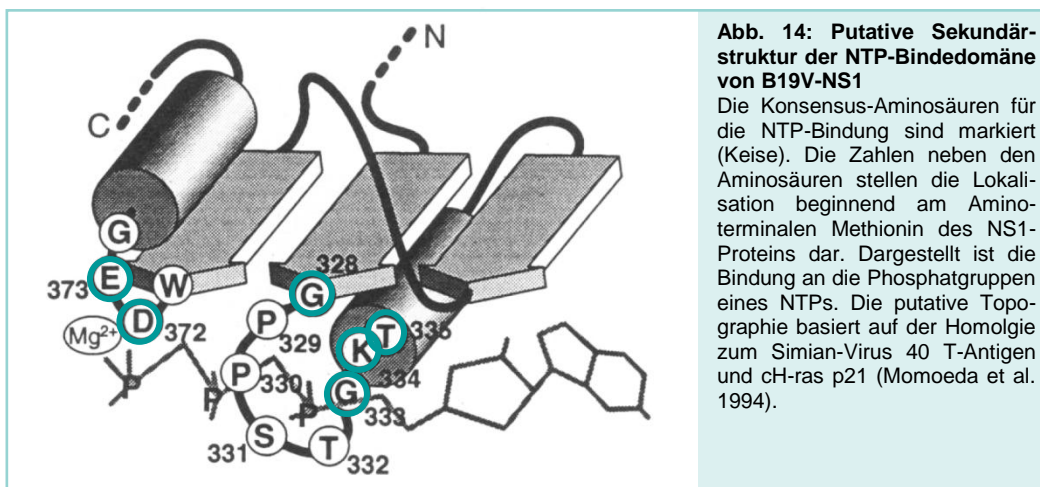
Die Zentralregion von B19V-NS1 enthält die konservierte Nucleosidtriphosphat (NTP)-Bindestelle und eine SF3-Helikasedomäne (AS 302 - 457; Gorbalenya et al. 1990; Momoeda et al.

1 Einleitung

1994). Der Carboxy-Terminus ist am wenigsten konserviert und für jede Parvovirus-Spezies einzigartig. Er übt vermutlich Funktionen in der Interaktion mit Wirtsproteinen und der Transaktivierung von Promotoren aus (Kerr 2006; Kivovich et al. 2010; Nüesch und Rommelaere 2006; Di Pasquale und Stacey 1998). Neben dem B19V-eigenen P6-Promotor werden weitere virale und zelluläre Promotoren wie z.B. HIV-1 und IL-6 durch B19V-NS1 aktiviert (Christensen et al. 1997; Christensen et al. 1995; Cotmore et al. 1986; Doerig et al. 1990; Raab et al. 2002).

1.5.1.1 NTP-Bindestelle

Die Nichtstruktur-Proteine der Parvoviren sind mit der Familie der ATP-abhängigen Helikasen oder DNA-abhängigen ATPasen verwandt. Diese DNA- und RNA-abgeleiteten NTPs sind Schlüsselemente in biochemischen Prozessen wie Replikation, Reparatur, Rekombination, Transkription und Translation (Momoeda et al. 1994; Gorbalenya und Koonin 1989). Das NTP-Bindemotiv besteht aus den vier funktionellen Domänen A, B, B' und C (Jindal et al. 1994; Toan et al. 2006b; Walker et al. 1997). Die Konsensus-Sequenzen der A- (AS 328 - 335, GXXXXGKT), B- (AS 371 - 374, XDEX), B'- (AS 385 - 398, K(X)₁₀QXK) und C-Domäne (AS 408 - 415, (X)₇N) sind über viele Virenspezies hoch konserviert und falten sich räumlich zu einer beta-alpha-beta-Struktur aus, der sogenannten Rossmann-Schleife (s. Abb. 14; Rossmann et al. 1974). Einzelne Aminosäuremutationen in den Konsensussequenzen können zum Funktionsverlust der NTP-Bindestelle führen. So geht beispielsweise mit dem Austausch des Lysins K334 ein Verlust der Zytotoxizität, die mit dieser Domäne assoziiert ist, sowie eine ausbleibende Transaktivierung des parvoviralen Promotors einher (Jindal et al. 1994; Momoeda et al. 1994).



1.5.2 Zellzyklusarrest durch B19V-NS1

B19V-NS1 kann den Zellzyklus beeinflussen, indem es dessen vielstufige Arretierung in verschiedenen Zellzyklusphasen auslöst. Der Zellzyklus folgt einem Wechsel aus DNA-Replikation in der S-Phase und Mitose in der M-Phase. Beide Stadien sind durch die „gap“-Phasen G_1 und G_2 getrennt. Die Zellzyklusprogression wird durch fortlaufende Aktivierung von cyclinabhängigen Kinasen (Cdks) genauestens reguliert. Die Aktivität der spezifischen Cdks wird durch Phosphorylierung ihrer katalytischen Untereinheiten und die Bindung an verschiedene Inhibitoren (Cdk-Inhibitoren) oder Aktivatoren (Cycline) geregelt, die während des Zellzyklus differenziell exprimiert werden (Morita et al. 2001). Verschiedene Cycline weisen individuelle Expressions- und Degradations-Muster auf, die zur zeitlichen Koordination der mitotischen Ereignisse beitragen (Alberts 2011).

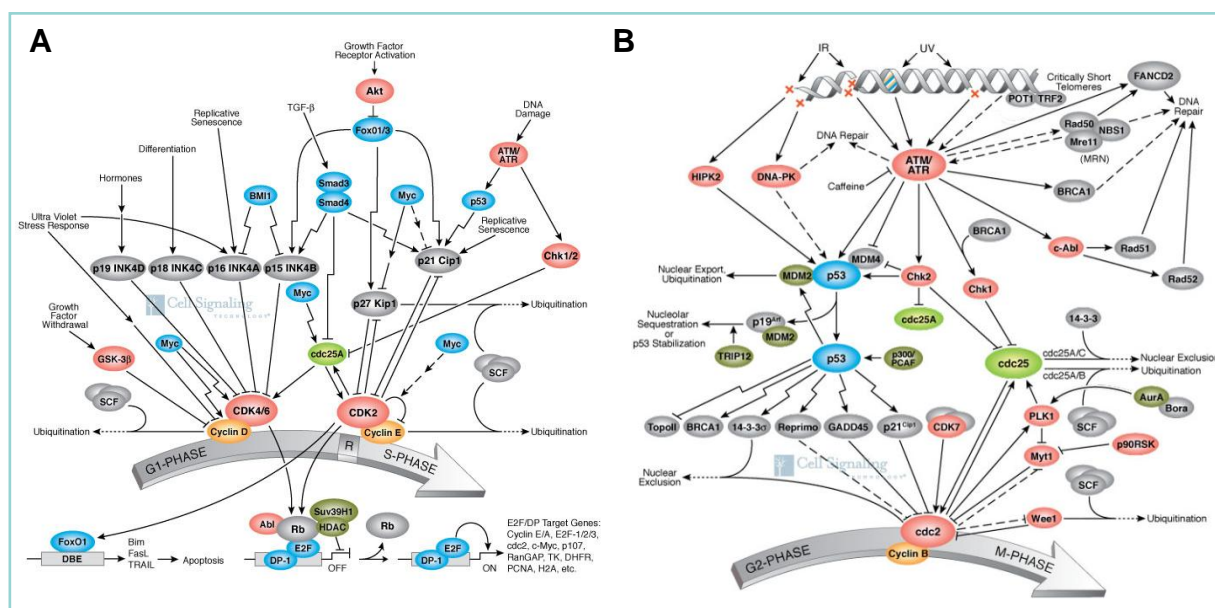


Abb. 15: Signalwege der Zellzykluskontrolle

A. Zwei Kinase-Komplexe, Cdk4/6-Cyclin D und Cdk2-Cyclin E arbeiten zusammen um die Inhibierung des dynamischen Transkriptionskomplexes aufzuheben, der die Proteine Rb und E2F enthält. Nach der Aktivierung von S-Phase-induzierenden Genen, tritt die Zelle aus der G_1 -Phase in die S-Phase ein. Ein Vielzahl verschiedener Stimuli sind an der Übergang-Kontrolle beteiligt, z.B. TGF- β , DNA-Schädigung oder der Entzug von Wachstumsfaktor. Diese Stimuli induzieren über Transkriptionsfaktoren die Expression von Mitgliedern der Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitoren INK4 und KIP/CIP und verhindern so die Zellzyklusprogression (Cell signaling 2012a). **B.** Der G_2 /M-Checkpoint dient dazu eine Zelle mit genomischen DNA-Schäden von der Mitose (M-Phase) abzuhalten. Der Übertritt in die M-Phase wird durch den Kinase-Komplex cdc2/Cyclin B gesteuert und über dessen Interaktion mit cdc25 aktiviert. Dieser wird bei Detektion von DNA-Schäden durch die Kinasen DNA-PK und ATM/ATR (*Ataxia telangiectasia related/mutated*) inaktiviert, einem Sensor für Einzelstrang- und Chromatinbrüche. Hierbei spielt die Aktivierung der p53-Signalkaskade ein wichtige Rolle, die über Faktoren wie 14-3-3 (= SFN), GADD45 oder p21^{CIP1} inhibierend auf den cdc2/Cyclin B-Komplex wirkt (Cell signaling 2012b).

Wie beim strukturell und funktionell äußerst ähnlichen NS1 aus MVM (*Minute virus of mice*) wurde beobachtet, dass auch B19V-NS1 den Zellzyklus in beiden *gap*-Phasen arretieren kann (de Op Beeck und Caillet-Fauquet 1997; de Op Beeck et al. 2001). Der Zellzyklusarrest in der G_1 -Phase hängt eng mit der Aktivität von p21/WAF1 zusammen, einem Negativregulator des G_1 -S-Übergangs (S. Abb. 15A). Es wurde gezeigt, dass B19V-NS1 die Expression von p21/WAF1 signifikant erhöht (Morita et al. 2003) und zusammen mit dem Transkriptionsfaktor Sp1 p21/WAF1 zusätzlich transaktiviert (Nakashima et al. 2004).

1 Einleitung

Auch die G₂-Phase des Zellzyklus kann durch B19V-NS1 unterbrochen werden, wie neuere Untersuchungen gezeigt haben. So soll eine NS1-Expression in erythroiden Vorläuferzellen zur Dysregulation von Mitgliedern der E2F-Familie von Transkriptionsfaktoren führen. Dies bewirkt einen p53-unabhängigen Zellzyklusarrest in G₂ und eine gesteigerte Virusreplikation bei gleichzeitiger Unterbrechung der erythroiden Differenzierung (Wan et al. 2010). In MVM kann NS1 außerdem als Folge seiner engen Assoziation mit der Wirts-DNA im Kern einen Zellzyklusarrest durch die Fragmentierung der zellulären DNA induzieren (de Op Beeck und Caillet-Fauquet 1997). Auch die Expression von B19V-NS1 führt in der Wirtszelle zu Chromatinläsionen (Poole et al. 2011).

Die Mechanismen dieses destruktiven Prozesses sind Gegenstand vieler aktueller Forschungen. So wurde beobachtet, dass die Zerstörung der Metallkoordinations-Domäne von B19V-NS1 dessen DNA-schädigende Wirkung und den G₁-Arrest sowie einen apoptotischen Zelltod in nicht permissiven HepG2-Zellen verhindert (Kivovich et al. 2012). Im permissiven Hintergrund ist die Mehrheit der NS1-Proteine in die virale Replikation und Genexpression eingebunden. Kivovich und Kollegen vermuten daher, dass in nicht permissiven Zellen die Endonuklease-Domäne des „unbeschäftigten“ NS1-Proteins für den Angriff auf die zelluläre DNA verantwortlich ist. Die teilweise kovalente Bindung von B19V-NS1 an die zelluläre DNA bewirkt Einzelstrangbrüche und Helix-Verformungen, die die ATR/ATM-Signalkaskade (s. Abb. 15) und die Poly(ADP-Ribose) Polymerase (PARP) in Aktion treten lassen und dadurch die DNA-Reparaturmaschinerie in Gang setzen (Morita und Sugamura 2002; Poole et al. 2011). Die Aktivierung von ATR/ATM führt zeitgleich über die zytosplasmatische Akkumulation von inaktivem Cyclin A, Cyclin B und phosphoryliertem cdc2 zum G₂-Arrest.

Die Antwort der Zelle auf DNA-Schädigungen kann nicht nur durch „echte“ DNA-Strangbrüche, sondern allein schon durch die *Hairpin*-Strukturen an beiden Enden der nicht-replikativen B19V-DNA ausgelöst werden, ohne dass eine virale Genexpression stattfindet (Morita und Sugamura 2002). Die Störung des Zellzyklus ist vermutlich eine Voraussetzung für die im nächsten Kapitel (Kap. 1.5.3) beschriebenen zytotoxischen Effekte des NS1-Proteins.

1.5.3 Zytotoxizität und Apoptose durch B19V-NS1

Apoptose bezeichnet eine Form des programmierten Zelltods und stellt einen Teil des zellulären Stoffwechsels dar, in dem eine Zelle ohne Schädigung des Nachbargewebes aufgrund extrinsischer (z.B. Entwicklung und Differenzierung) oder intrinsischer Faktoren (z.B. schwere Schädigungen des Erbguts) zugrunde geht (Lawen 2003). Bei B19V-infizierten fötalen erythroiden Vorläuferzellen wurde Apoptose erstmals bei elektronenmikroskopischen Untersuchungen beobachtet (Morey et al. 1995; Morey et al. 1993) und später in einer

erythroiden Zelllinie nach Transfektion mit B19V-NS1 durch Caspase-3-Aktivierung nachgewiesen (Moffatt et al. 1998; Ozawa et al. 1988; Sol et al. 1999). Sowohl die Fähigkeit Zytotoxizität und Apoptose als auch den oben beschriebenen Zellzyklusarrest hervorzurufen, ist eng mit den enzymatischen Domänen von B19V-NS1 assoziiert. Aminosäuremutationen in diesen Domänen (NTP-Bindestelle oder Metallkoordinations-Domäne) führen zum Funktionsverlust und heben gleichzeitig deren schädigende Wirkung auf (Kivovich et al. 2012; Momoeda et al. 1994; Poole et al. 2006).

Der molekulare Mechanismus der zytotoxischen Wirkung des B19V-NS1 Proteins ist noch nicht vollständig aufgeklärt. Einige Arbeitsgruppen vermuten jedoch, dass die DNA-modifizierenden Aktivitäten von NS1 (NTP-Bindung, Helikase, Nickase, Transkriptionsfaktor-Aktivität) durch Schädigung der zellulären DNA Apoptose induzieren (Kivovich et al. 2012; Poole et al. 2011). Diese Hypothese wird durch die Aktivierung des Caspase-9-abhängigen Signalwegs, der mit Apoptose durch DNA-Schädigung einhergeht und die bei B19V-Infektionen/NS1-Transfektionen bereits nachgewiesen wurde, unterstützt (Hsu et al. 2004; Poole et al. 2006). Weitere Studien haben gezeigt, dass außerdem mitochondriale Apoptose-Signalwege unter der Beteiligung von TNF- α (Sol et al. 1999), p53 (Yaegashi et al. 1999), Bax, Pro-Caspase 3 (Morita und Sugamura 2002) und Caspase 3 (Lupescu et al. 2009) aktiviert werden und proapoptische Ereignisse wie DNA-Fragmentierung, erhöhte Annexin-V-Bindung, Phosphatidylserin-Präsentation und eine Reduktion des Zellvolumens nach B19V-NS1-Expression detektiert werden können (Bock et al. 2005; Lupescu et al. 2009).

Während die Apoptose in der replikativen Phase permissiver Zellen nur langsam einsetzt (s. Abb. 16), wirkt B19V-NS1 in nicht-permissiver Zellen schneller zytotoxisch, was mit der Überexpression des Proteins in Zusammenhang stehen kann (Caillet-Fauquet et al. 1990; Liu et al. 1992; Ozawa et al. 1988; Poole et al. 2004). Der prototypische NS1-induzierte Zellzyklusarrest sowie die Apoptose sind charakteristische Ereignisse für die Pathophysiologie einer B19V-Infektion in infizierten erythroiden Vorläuferzellen und tragen beide zu deren Zerstörung bei (Brown et al. 1994b; Moffatt et al. 1998; Sol et al. 1999).

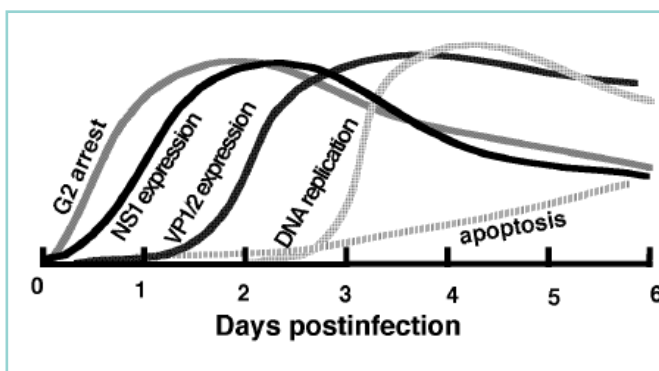


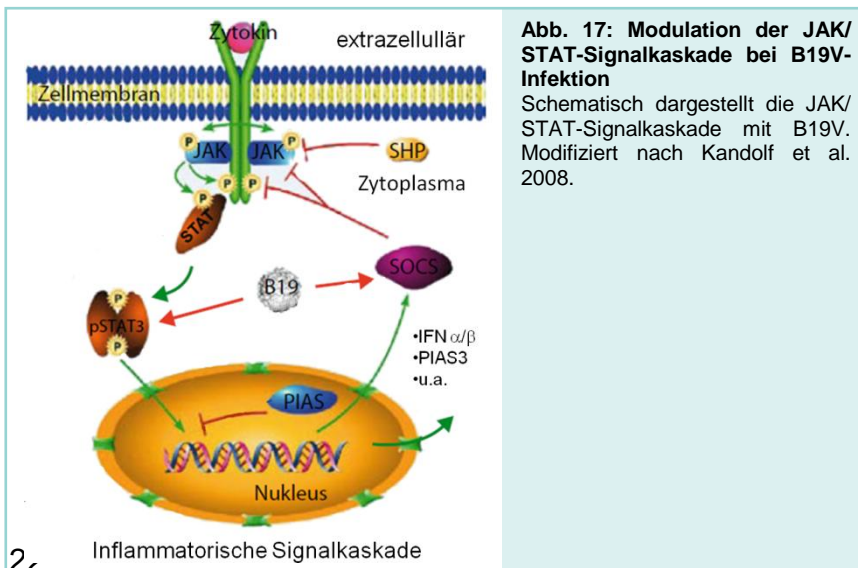
Abb. 16: Schematisch Darstellung der zellulären Ereignisse in permissiven UT-7/EPO-Zellen nach Infektion mit B19V

Kurz nach Beginn der B19V-NS1-Expression setzen apoptotische Prozesse ein. Der Zellzyklusarrest in der G₂-Phase wird hier vermutlich durch das Auftreten der viralen *Hairpin*-DNA verursacht (Morita und Sugamura 2002).

1.6 Modulation von Signalwegen durch B19V-NS1

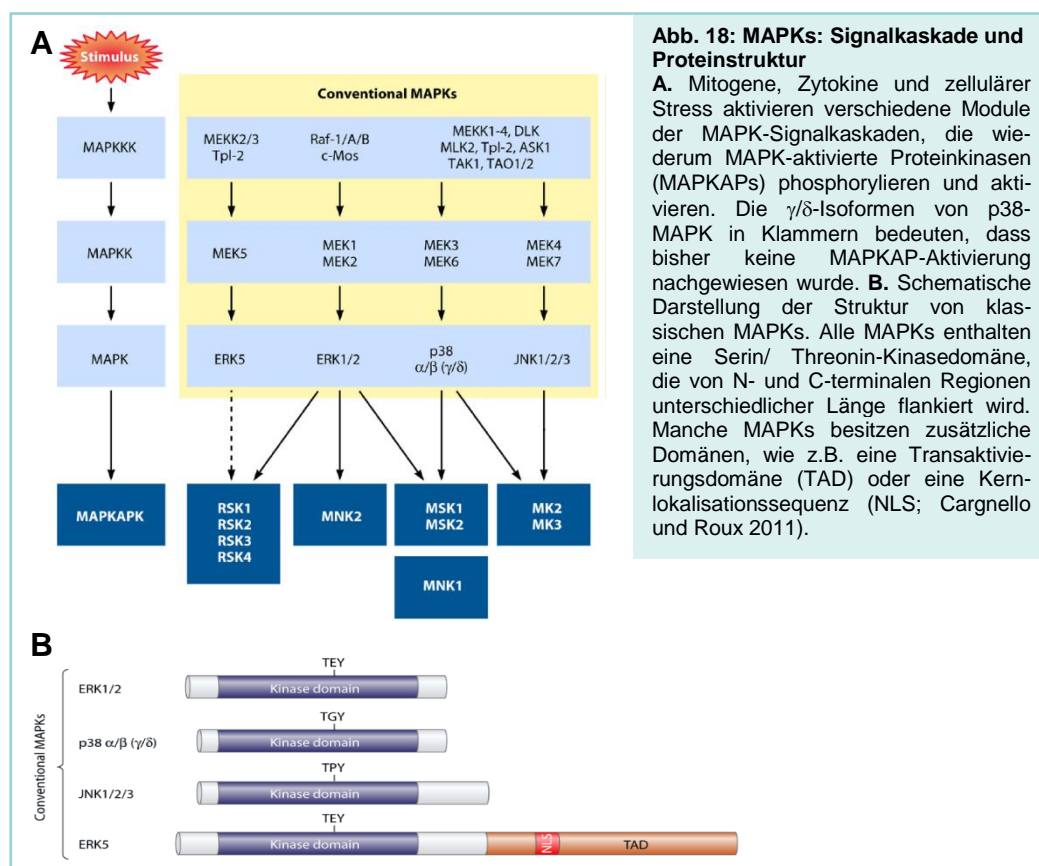
Welche intrazellulären Prozesse B19V beeinflusst, die zu der Etablierung einer B19V-assoziierten iCMP und anderen klinischen Manifestationen führen, ist noch nicht ausreichend geklärt und Gegenstand der aktuellen Forschung. Neben entzündungsfördernden Signalwegen wie z.B. JAK/STAT (Januskinase/*Signal transducers and activators of transcription*) sind hier auch Signalwege von Bedeutung, die für die Aufrechterhaltung einer funktionellen EC essentiell sind, wie z.B. der eNOS-Signalweg. Kürzlich wurde beschrieben, dass inflammatorische Signalwege, wie z.B. der JAK/STAT-Signalweg, von B19V moduliert werden, die die EC-Funktion beeinflussen können (Duechting et al. 2008). Während B19V-Infektionen wurden hohe Konzentrationen an proinflammatorischen Zytokinen gemessen, besonders Interleukin(IL)-1 β , IL-6, Interferon- γ und TNF- α (Kerr et al. 2001; Nigro et al. 2000; Sol et al. 1999; Tzang et al. 2008). Hierbei kann der virale Transaktivator B19V-NS1 sowohl die Produktion von IL-6 als auch die von TNF- α stimulieren und durch diesen Prozess assoziierte Signalwege aktivieren (Fu et al. 2002; Mitchell 2002; Moffatt et al. 1996).

Die genetische Variabilität des Wirts bei der Zytokinantwort steht in Zusammenhang mit der Wahrscheinlichkeit während einer B19V-Infektion Symptome wie Arthralgien oder Erytheme zu entwickeln (Kerr et al. 2003). Von IL-6 wird unter anderem der JAK/STAT-Signalweg aktiviert. Eine funktionelle Studie von Düchting und Kollegen ergab eine Modulation dieses Signalwegs und der damit verbundenen Faktoren und Zielgene durch B19V-NS1 (s. Abb. 17; Duechting et al. 2008). B19V-NS1 aktiviert die Faktoren STAT3 und PIAS3 (*Protein inhibitor of activated STAT*) und inhibiert STAT1 und SOCS1/3 (*Suppressor of cytokine signaling*) wodurch es zu einer Deregulierung von Genen der Immunantwort wie z.B. IFNAR1 und IL-2 durch STAT3 kommt. Diese Prozesse können zu Mechanismen beitragen, mit denen B19V das Immunsystem umgeht und eine persistente Infektion in humanen EC etabliert. Folglich kann das B19V-NS1-Protein eine wichtige Rolle in der viralen Pathogenese einer B19V-assoziierten iCMP spielen.



1.6.1 MAPK-Signalwege

Neben dem JAK/STAT-Signalweg spielt der inflammatorische MAPK (*Mitogen-activated protein kinase*)-Signalweg eine wichtige Rolle für die EC-Funktion. Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) sind eine hoch konservierte Familie von Serin/Threonin-Kinasen, die einen extrazellulären Stimulus in ein großes Spektrum an zellulären Antworten umwandeln können. Der MAPK-Signalweg spielt bei vielen komplexen Prozessen wie Proliferation, Migration, Stoffwechsel, Differenzierung, und Apoptose eine Rolle (Rubinfeld und Seger 2005) und kann durch unterschiedliche Reize wie Zytokine, Wachstumsfaktoren, Infektionen oder Stressfaktoren aktiviert werden (Baccarini 2005; Cargnello und Roux 2011; Meloche und Pouysségur 2007). MAPKs unterteilen sich in klassische und atypische MAPKs. Die klassischen MAPK lassen sich wiederum in vier Gruppen, auch Module genannt, gliedern (s. Abb. 18A): ERK1/2 (*Extracellular signaling related kinase*; auch p44/42), p38-Isoformen (α , β , γ und δ), JNK1/2/3 (*c-Jun amino (N)-terminal kinase*) und ERK 5 (Cargnello und Roux 2011). Neben diesen MAPKs sind noch atypische MAPKs charakterisiert worden, die sich jeweils durch individuelle Besonderheiten auszeichnen (Coulombe und Meloche 2007). Zu ihnen gehören ERK3/4, ERK7 und NLK (*Nemo-like kinase*). Über die Aktivierung der atypischen MAPKs ist wenig bekannt, da sie nicht viele Charakteristika der klassischen MAPKs teilen, wie bspw. die Organisation in 3-teilige Aktivierungskaskaden. Die atypischen MAPKs haben jedoch mit den klassischen MAPKs gemeinsam, dass sie ihre Zielsubstrate an Serin- und Threoninresten phosphorylieren (Cargnello und Roux 2011).



1 Einleitung

Die Aktivierung des klassischen MAPK-Signalwegs beginnt durch Bindung eines Liganden an Rezeptoren wie z.B. RTKs (Rezeptor-Tyrosin-Kinasen) oder Zytokinrezeptoren mit assoziierter JAK. Ein Adapterprotein mit SH2-Domäne (*Src-homology domain*, z.B. Grb2) und der Guanidin-Austauschfaktor SOS (*Son of sevenless*) werden zum Rezeptor rekrutiert und durch Phosphorylierung aktiviert. SOS wiederum fördert die Aktivierung eines membran-gebundenen Proteins des Ras/Rho-Typs, einer Familie kleiner GTP-bindender Proteine. Das aktive Ras/Rho setzt nun eine Proteinkinase-Kaskade aus fortlaufenden Phosphorylierungen in Gang (s. Abb. 18A), die in jeder Gruppe der klassischen MAPKs aus einer Reihe von drei evolutionär konservierten Kinasen besteht. An deren Anfang steht eine MAP Kinase Kinase Kinase (MAPKKK bzw. MAP3K), gefolgt von einer MAP Kinase Kinase (MAPKK bzw. MAP2K) und letztlich einer MAP Kinase (MAPK; Alberts 2011). Die große Bandbreite an Funktionen, die durch MAPKs reguliert werden, wird schließlich durch Phosphorylierung multipler Substrate vermittelt (Roux und Blenis 2004). Zu den zellulären Prozessen, die durch MAPK-Signalwege reguliert werden, zählen Regulation der Genexpression, Mitose, Metabolismus, Zellmotilität, Überleben, Apoptose und Differenzierung (Cargnello und Roux 2011).

1.6.1.1 p44/42-ERK1/2

p44/42-ERK ist Hauptregulator für die Transition von der G₁- zur S-Phase und sorgt sowohl für die Stabilisierung des CyclinD1-Cdk4/6-Komplexes, der diesen Übergang fördert, als auch für die Induktion der Expression des Zellzyklus-Inhibitors p21 (Bottazzi et al. 1999). Starke Aktivierung von p44/42-ERK führt sowohl zu reversiblen als auch zu permanentem Zellzyklus-Arrest (Meloche und Pouysségur 2007).

Mitglieder der Raf-Familie (*Rapidly accelerated fibrosarcoma*) agieren neben Mos (*Moloney murine sarcoma*) primär als MAPKKK, diese aktivieren die MAPKKs MEK1 und MEK2 (MAPK/ERK Kinase; Murphy und Blenis 2006; Rubinfeld und Seger 2005). Diese beiden ERK-Kinasen aktivieren das humane p44/42-ERK durch Phosphorylierungen der Threonin- und Tyrosinreste auf den Positionen 202/204 bzw. 185/187, die in der Aktivierungsschleife lokalisiert sind (s. Abb. 18B; Cargnello und Roux 2011).

Es wurden bereits verschiedene Faktoren identifiziert, die durch ein aktives pp44/42-ERK oder *downstream* gelegene MAPKAPs (MAPK-aktivierte Proteinkinasen) aktiviert werden: Proteine der Zellzyklus-Signalgebung wie Elk-1, c-Fos und AP-1 (Kortenjann et al. 1994; Marais et al. 1993; Meloche und Pouysségur 2007), Transkriptionsfaktoren wie NF-AT (*Nuclear factor of activated T-cells*), MEF2 (*Myocyte enhancer factor 2*), c-Myc und STAT3 und Bestandteile des Zytoskeletts (Neurofilamente und Paxillin; Cargnello und Roux 2011).

1.6.1.2 p38-MAPK

Die MAPK p38 wird durch eine Vielzahl von zellulären Stressfaktoren wie osmotischem Schock, UV-Strahlung, DNA-Schädigung, bakteriellen Lipopolysacchariden, verschiedenen Wachstumsfaktoren und inflammatorischen Zytokinen wie IL-1 und TNF- α aktiviert (Freshney et al. 1994; Lee et al. 1994). Viele MAPKKs aktivieren diesen Signalweg: MEKK1 - 3 (MEK Kinase), MLK2/3 (*Mixed lineage kinase*), ASK1 (*Apoptosis signal regulating kinase*), Tpl2 (*Tumor progression locus*) und TAO1/2 (*Thousand and one amino acid protein kinase*; Cuadrado und Nebreda 2010). MEK3 und MEK6 stellen dabei den Hauptaktivator der p38-MAPK dar und aktivieren sie durch eine Phosphorylierung an Thr180 und Tyr182 (Lewis et al. 1998). Es konnten bisher vier Isoformen von p38-MAPK identifiziert werden, die differenziell exprimiert und aktiviert werden: p38 α (MAPK14), β (MAPK11), γ (MAPK12, ERK6 oder SAPK3 [*Stress-activated protein kinase*]) und δ (MAPK13 oder SAPK4; Hale et al. 1999). Die Isoformen unterscheiden sich im Expressionsmuster und haben spezialisierte Funktionen, die jedoch im Detail noch nicht vollständig geklärt sind (Cuadrado und Nebreda 2010; Jiang et al. 1996). Nach Stimulation aktiviert p38-MAPK eine große Zahl an Substraten im Zytoplasma und Zellkern. Dazu gehören cPLA1, MNK1/2, MK2/3, HuR, Bax, Tau, ATF1/2/6, MEF2, Elk-1, p53 und MSK1/2 (Cuadrado und Nebreda 2010).

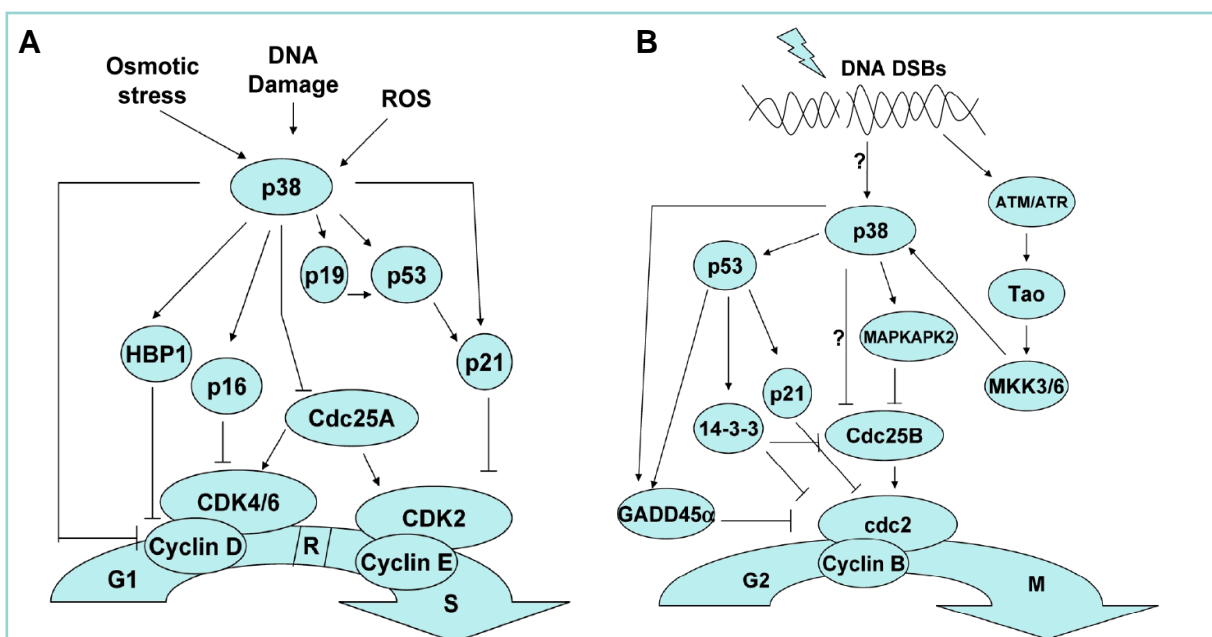


Abb. 19: Rolle von p38-MAPK beim Zellzyklusarrest

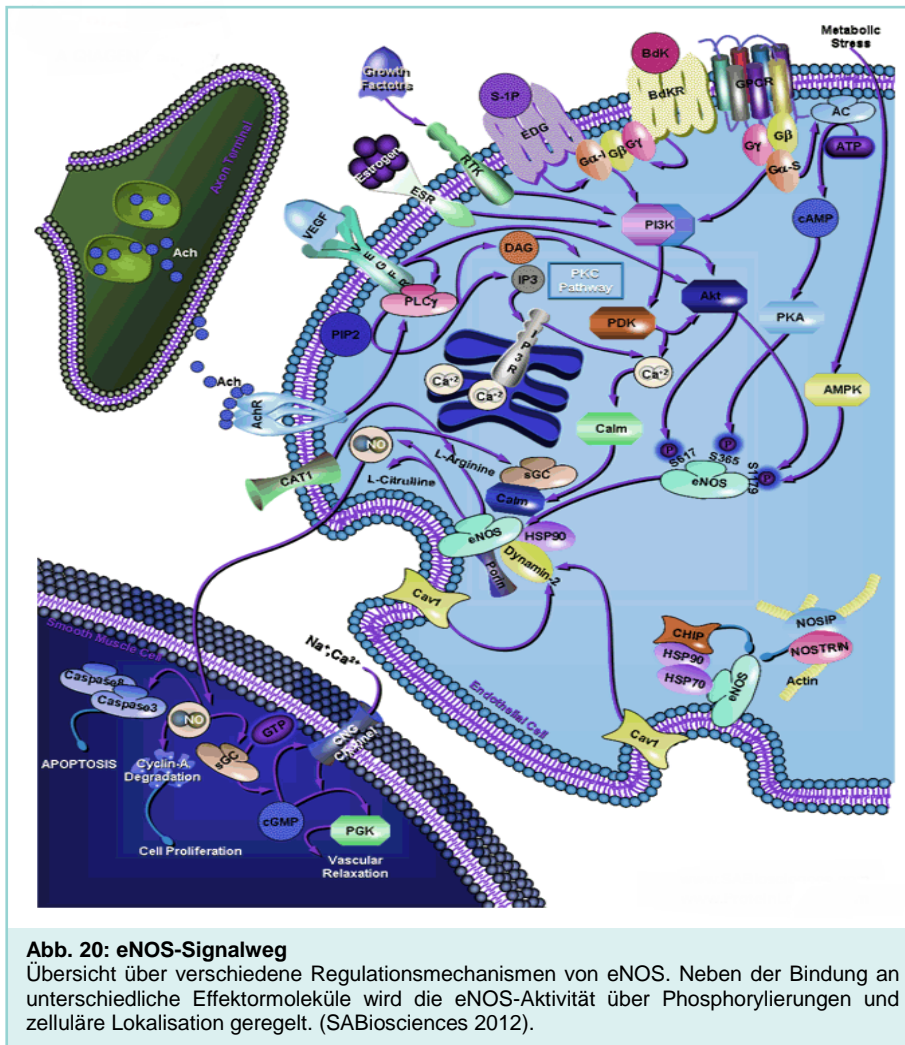
A. p38-MAPK kann den G₁/S-Arrest durch Aktivierung von p53 induzieren, das wiederum zu einer Akkumulation von p21 mit resultierender Cdk2-Hemmung führt. Über die Hochregulierung des Cyclin-abhängigen Kinase-Inhibitors p16 und die Inhibierung der Cyclin-abhängigen Phosphatase Cdc25 kann zudem die Cyclin-Aktivität und das Fortschreiten des Zellzyklus verhindert werden. **B.** Der G₂/M-Arrest unter p38-Beteiligung wird meist durch DNA-Schädigungen induziert und ähnlich wie im G₁-Arrest auch über p53 und GADD45 α , 14-3-3 und p21 reguliert. Letzteres kann direkt von p38 stabilisiert werden. p21 inhibiert in diesem Fall cdc2. Eine Inhibierung p38-MAPK-vermittelte Phosphorylierung von Cdc25 führt ebenso zum Zellzyklusarrest bei G₂ (Thornton und Rincon 2009).

1 Einleitung

p38-MAPK spielt in der Immun- und Entzündungsantwort eine entscheidende Rolle und besitzt eine Hauptfunktion bei der Produktion proinflammatorischer Zytokine. Die Kinase kann die Zytokin-Expression durch Modulation der Transkription von Faktoren wie dem Transkriptionsfaktor NF- κ B (*Nuclear factor* κ B; Karin 2006) regulieren oder auf mRNA-Ebene über die *MAPK interacting* Kinase MNK (Buxade et al. 2008) und die Kinase MK2/3 (Ronkina et al. 2008) deren Stabilität und Translation beeinflussen. Ebenso wurde gezeigt, dass p38-MAPK eine Rolle bei Proliferation und Überleben von Zellen spielt. Abb. 19 veranschaulicht, wie p38-MAPK die Zellzyklusprogression sowohl bei G₁/S als auch bei G₂/M durch eine Reihe von Mechanismen wie die Herunterregulierung von Cyclinen und die Hochregulierung von Cdk-Inhibitoren negativ modulieren kann (Thornton und Rincon 2009). Obwohl einige Studien einen positiven Einfluss von p38-MAPK auf das Überleben einer Zelle beschreiben, wurde p38-MAPK von vielen anderen mit der Induktion von Apoptose durch zellulären Stress in Verbindung gebracht. So induziert p38-MAPK beispielsweise in mitotisch blockierten Zellen durch Aktivierung von Bax (ein Kofaktor des Tumorsuppressors p53) eine Bcl (*B-cell lymphoma*)-Translokation in die Mitochondrien, die schlussendlich den Zelltod zur Folge hat (Deacon et al. 2003).

1.6.2 eNOS

Stickstoffmonoxid (NO) ist an einer Vielzahl physiologischer und pathophysiologischer Prozesse im kardiovaskulären System beteiligt und spielt bei der Regulation und Homöostase von ECs eine Schlüsselrolle (Dudzinski et al. 2006; Seddon et al. 2007). NO ist ein kurzlebiges Signalmolekül, dessen Bildung durch die NO-Synthase (NOS) aus der Aminosäure L-Arginin katalysiert wird. Von diesem Enzym existieren drei Isoformen: Typ 1 nNOS (neurales NOS), Typ 2 iNOS (induzierbares NOS) und Typ 3 eNOS (endotheliales NOS). Eine Dysregulation des zellulären NO-Haushalts kann u.a. zu Inflammation, Hypoxie oder dem Verlust der endothelialen Barrierefunktion führen (Dossumbekova et al. 2008; Justice et al. 2000; Otani 2009), daher muss die NO-Produktion genauestens dosiert werden. Aus diesem Grund ist eNOS in ein enges Netz aus Kontroll- und Regulationsmechanismen eingebettet (s. Abb. 20; Dudzinski und Michel 2007). Diese Regulierung bezieht Protein-Protein-Interaktionen, Ca²⁺-Ströme, Veränderung der Lokalisation von eNOS innerhalb der Zelle und zahlreiche Kinasen und Phosphatasen mit ein, die mit vielen verschiedenen anderen Signalwegen verknüpft sind (Mount et al. 2007).

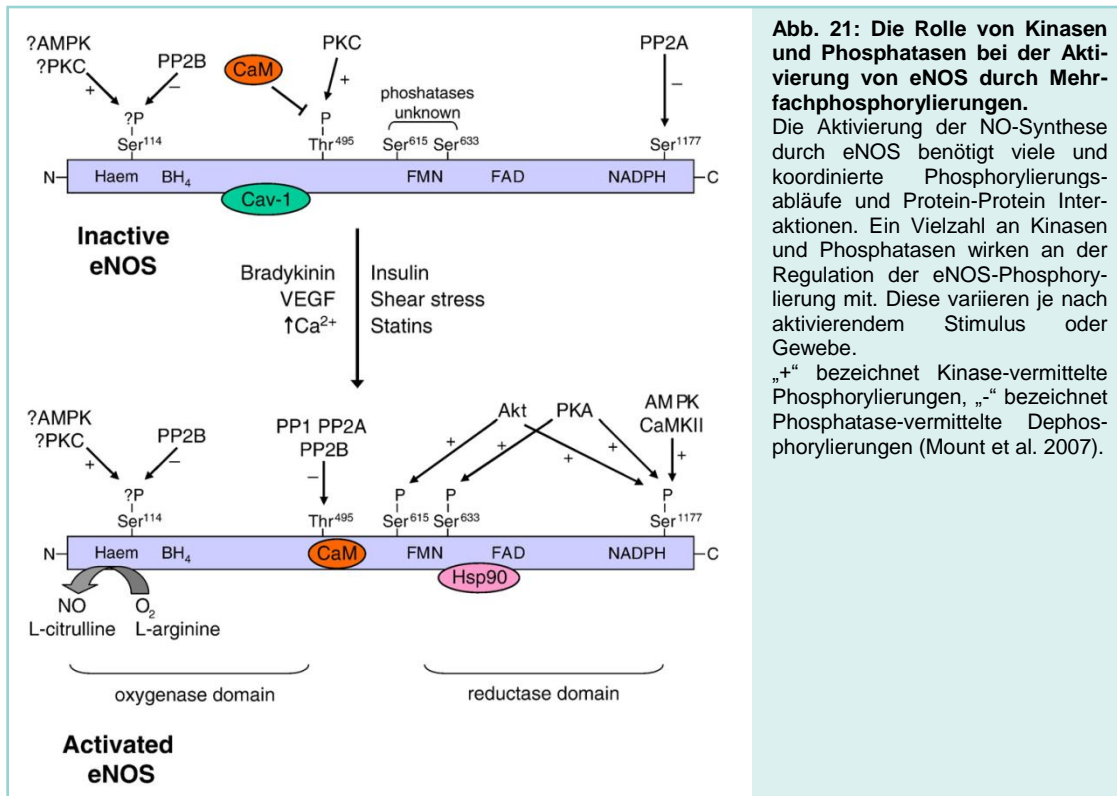


Die NO-Produktion in ECs wird durch eine Vielzahl mechanischer Kräfte wie Scherstress und zyklische Belastung aufgrund hämodynamischer Kräfte stimuliert (Boo et al. 2002). Diese Kräfte aktivieren intrazelluläre Signalkaskaden über eine Kopplung an G-Proteine, die wiederum den Reiz über Faktoren wie PI3K (Phosphatidylinositol 3-Kinase), PDK (Phosphoinositol-abhängige Kinase) und ADCY (Adenylatzyklase) weiterleiten. Auch humorale Faktoren wie VEGF (*Vascular endothelial growth factor*), Ach (Acetylcholin), ESR (Östrogen) und S1P (Sphingosin-1-Phosphat) aktivieren durch Bindung an ihre Rezeptoren (VEGFR, RTKs, ESR, EDG und BDKR) den PI3K/Akt-Signalweg. Ebenso werden PLC- γ (Phospholipase C) und PIP2 (Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat) aktiviert, was folglich zu einem Anstieg des zytosolischen Ca^{2+} - und DAG (Diacylglycerol)-Gehalt führt und dadurch die Aktivierung von eNOS begünstigt (Dudzinski und Michel 2007; Fleming und Busse 2003).

Im Ruhezustand ist eNOS über Myristoylierungen und Palmitoylierungen an der äußeren Plasmamembran in Caveolae lokalisiert und wird durch die Bindung an das Strukturprotein Caveolin-1 (Cav1) sowie eine phosphorylierte Thr⁴⁹⁵-Stelle inhibiert. Die Aktivierung erfolgt stufenweise. Agonisten induzieren einen Ca^{2+} -Einstrom und führen zur Bindung von

1 Einleitung

Calmodulin (Calm) an eNOS, einem essentiellen Kofaktor, der die Ablösung von Cav1 vermittelt und die Ausrichtung der Oxygenase- und Redukase-Domänen von eNOS fördert. Die aktive Form von eNOS besteht aus einem heterogenen Tetramer von zwei monomeren eNOS-Molekülen und zwei Ca^{2+} /Calm-Komplexen (Dudzinski und Michel 2007; Fleming und Busse 2003; Minshall et al. 2003; Mount et al. 2007; Ostrom et al. 2004).



Das HSP90 (*Heat shock protein-90*) erleichtert das Arrangement des aktiven eNOS-Molekülkomplexes durch Dephosphorylierung des inhibierenden Thr⁴⁹⁵. Der eNOS/HSP90/ Calm-Komplex rekrutiert PI3K-stimuliertes Akt, das eNOS an Ser¹¹⁷⁷ und Ser⁶¹⁵ phosphoryliert, was wiederum die katalytische Rate des Enzyms verstärkt und zu einem erhöhten Elektronenfluss zwischen der Oxygenase- und Reduktasedomäne führt (Fontana et al. 2002). Nach längerer Aktivierung verlässt eNOS vesikelgebunden die Caveolae und wird durch NOSTRIN (*NOS traffic inducer*) und NOSIP (*NOS interacting protein*) entlang von Aktinfilamenten zu intrazellulären Kompartimenten transportiert (Sánchez et al. 2006). Während der Relokalisation wird eNOS durch vielfältige Mechanismen langsam inaktiviert. Durch die zunehmende Entfernung zu zytoplasmatischen Ca^{2+} -Strömen schwindet die Stimulation durch Calm und damit wird eNOS nach und nach von aktivierenden Signalwegen entkoppelt (Jagnandan et al. 2005). Am Endpunkt des retrograden Transports in der perinukleären Region wird eNOS graduell stillgelegt und zur Zellmembran zurück transportiert (Dudzinski und Michel 2007)

Eine akute Aktivierung von eNOS führt zur Produktion von NO-Molekülen und stromab in benachbarten glatten Muskelzellen zur Aktivierung von sGUCY (*Soluble guanylat cyclase*), der Produktion von cGMP (*Cyclic guanosin monophosphat*) und der Degradierung von Cyclin-A. Ein Anstieg des intrazellulären cGMP-Levels beeinflusst den vaskulären Tonus durch Verringerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und wird ausgelöst durch Modulation des CNG Kanals (*Cyclic nucleotid gated ion channel*) und der PRKG (Proteinkinase G; Minshall et al. 2003).

Bisher ist nicht bekannt, ob B19V einen Einfluss auf die eNOS-Signalgebung ausübt. Jedoch wurde bereits beobachtet, dass sich das Virus auf die intrazelluläre Ca^{2+} -Homöostase auswirkt, die eng mit der eNOS-Regulierung zusammenhängt (Lupescu et al. 2006). Das B19V-VP1-Protein löst mit seiner PLA2-Aktivität eine Aktivierung des Ca^{2+} -Einstrom in die Zelle aus und kann so möglicherweise zu einer ED und der Modulation der endothelialen Barrierefunktion beitragen. Ob diese Kausalitätskette eine eNOS-Beteiligung mit einschließt, müssen weitere Untersuchungen zeigen.

1.7 Zielsetzung der Arbeit

Die B19V-Infektion kann Ursache einer inflammatorischen Kardiomyopathie (iCMP) mit endothelialer und enddiastolischer Dysfunktion sein. Als Zielzellen von B19V im Herzmuskel wurden myokardiale Endothelzellen (EC) identifiziert. Die B19V-Infektion führt in den ECs zu einer Deregulation des zellulären Gleichgewichts und kann pathophysiologische Vorgänge wie die endotheliale Aktivierung und Dysregulation nach sich ziehen. Die zugrunde liegenden molekularen und zellulären Interferenzmechanismen zwischen B19V-Infektion und EC-Funktion, die maßgeblich an der Entwicklung einer B19V-iCMP beteiligt sein können, sind bislang noch nicht vollständig verstanden und Gegenstand der vorliegenden Arbeit.

Ziel der vorliegenden Promotionsarbeit war es, in funktionellen Experimenten an B19V-permissiven UT-7/EPO- und semi-permissiven hMEC-1-Zellen Interaktionen zwischen B19V, dem funktionellen B19V-NS1-Protein und der inflammatorischen und proapoptischen Signaltransduktion, insbesondere den MAPK- und eNOS-Signalwegen zu untersuchen, um inflammatorische Mechanismen der B19V-induzierten iCMP zu klären. Die differenzielle Regulierung dieser Signalwege wurde dabei auf Protein- und Genexpressionsebene untersucht. Welche Rolle bei der MAPK-Regulation die NTP-Bindestelle des NS1-Proteins spielt, wurde mit einer artifiziellen NS1-Mutante (K334E) analysiert. In einem weiteren Schritt wurde untersucht, ob und welche zellulären Proteinen mit B19V-NS1 direkt interagieren. Dazu wurden in Interaktionsstudien bisher unbekannte zelluläre Proteine analysiert, die in direkter Wechselwirkung mit dem viralen Effektorprotein B19V-NS1 stehen können.

Um zu klären, ob Sequenzvariationen im B19V-Genom, wie z.B. die oben genannte NS1-Mutante der NTP-Bindestelle, Einfluss auf virale Prozesse wie Replikation, Persistenz und Virus-Wirt-Interaktion und somit auf die klinische Manifestation der B19V-Infektion des humanen Herzens haben, wurden patientenspezifische B19V-Isolate auf funktionsverändernde Mutationen untersucht und mit klinischen Charakteristika der B19V-Infektion verglichen. In diesem Zusammenhang wurden genotypspezifische Sequenzvarianten phylogenetisch eingeordnet.

2 Material und Methoden

2.1 Zellkultur

2.1.1 Zelllinien und Zellkulturmedien

hMEC-1 (Ades et al. 1992), Humane mikrovaskuläre Endothelzellen

hMEC-1-Medium

- Medium 199 (Invitrogen)
- 15 % FCS (Fötale Kälberserum, PAA)
- 1 % Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep, PAA)
- 1 µg/ml Hydrocortison (Invitrogen)
- 10 ng/ml ECGS (*Endothelial cell growth supplement*, BD Biosciences)

UT-7/EPO (Komatsu et al. 1993), B19V-permissive humane Leukämiezelllinie mit megakaryoblastischem Phänotyp

UT-7/EPO-Medium

- RPMI (PAA)
- 10 % FCS
- 1 % Pen/Strep

Die Kultivierung der Zellen erfolgte in einem Brutschrank bei 37° C, 5 % CO₂ und 100 % relativer Luftfeuchtigkeit in Zellkulturflaschen von 75 cm² Kultivierungsfläche (Nunc). Adhärente hMEC-1-Zellen wurden bei Konfluenz (ca. 3 × 10⁷ Zellen, nach 3 - 4 Tagen) mit 10 ml 1 × PBS (*Phosphate buffered saline*, s.u.) gewaschen und mit 2 ml 1 × Trypsin-EDTA (PAA) für 3 min inkubiert, bis sich die Zellen durch leichtes Klopfen an der Zellkulturflasche ablösten. Zum Abbruch der Trypsinierung wurden die Zellen in 10 ml hMEC-1-Medium resuspendiert und mit einem Verdünnungsverhältnis 1:4 bis 1:6 in neue Flaschen ausgesät. Das Endvolumen der Zellsuspension in den Kulturflaschen wurde auf 20 ml mit hMEC-1-Medium aufgefüllt. Zellzahlen wurden durch Auszählen unter dem Lichtmikroskop in der Neubauer Zählkammer ermittelt.

Die Suspensionszelllinie UT-7/EPO wurde alle drei bis vier Tage gesplittet. Dazu wurde die Hälfte der Zellsuspension verworfen und durch das gleiche Volumen UT-7/EPO-Medium ersetzt. 2 µg/ml EPO (Erythropoietin, Genaxxon) wurden zur Zellsuspension hinzugefügt.

10× PBS

- 1,37 M NaCl (Merck)
- 27 mM KCl (Roth)
- 15 mM KH₂PO₄ (Sigma)
- 117 mM NaH₂PO₄ (Merck)
- In dH₂O auflösen, pH 7,4 mit HCl einstellen, autoklavieren

2.1.2 Kryokonservierung

Um die Zellen langfristig aufzubewahren, wurden diese in flüssigem Stickstoff tiefgefroren. Die mit Trypsin/EDTA abgelösten (s. Kap. 2.1.1) und sedimentierten Zellen (Zentrifugation bei RT, 1000 rpm, 3 min) einer Kulturflasche ($3 - 5 \times 10^6$ Zellen) wurden in 1 ml Kryomedium (s.u.) aufgenommen, in ein Kryokonservierungsröhrchen (Roth) überführt und dieses bei -80°C eingefroren. Am folgenden Tag wurden die Zellen in flüssigen Stickstoff überführt.

Kryomedium

- 90 % FCS
- 10 % Dimethylsulfoxid (DMSO; Serva Electrophoresis)

2.2 Isolation von Parvovirus B19-Partikeln aus humanem Serum

2.2.1 Aufreinigung der Parvovirus B19-Partikel mittels Saccharosekissen

Aus 20 g Saccharose (Roth) und 100 ml 1 × PBS wurde eine 20 %ige Lösung hergestellt und steril filtriert. Je 1 ml wurde in Zentrifugationsröhrchen (Sorvall; Thermo Fischer Scientific) pipettiert und bei -20°C eingefroren. Ein 5 ml Aliquot eines B19V-hochtitriges Serums ($2 \times 10^{10} - 8 \times 10^{11}$ Partikel/ml, Blutbank Frankfurt a.M., Dr. Schmidt, Prof. Rohde), das von einem Patienten mit akuter B19V-Infektion stammte und aus den laufenden Blutspenden aussortiert wurde, wurde zur besseren Pipettierbarkeit mit 1:1 1 × PBS verdünnt und auf zwei vorbereitete Zentrifugationsröhrchen verteilt. Das bei -20°C gefrorene Saccharosekissen erleichterte die Überschichtung mit Serum. Die Gefäße wurden mit 1 × PBS aufgefüllt, um ein Kollabieren in der Ultrazentrifuge zu vermeiden und exakt austariert. Die Zentrifugation erfolgte für 90 min bei 100.000 g und 4°C . Der Überstand wurde anschließend dekantiert und das (nicht sichtbare) Pellet in 2 ml 1 × PBS resuspendiert. Diese Suspension wurde in einen Dialyseschlauch (Roth; Ausschlussgrenze 14 kDa) transferiert und über Nacht bei 4°C gegen 2000 ml 1 × PBS auf dem Magnetprüher dialysiert.

2.2.2 Quantifizierung der B19V-Konzentration

Die Bestimmung des Virustiters erfolgte über eine quantitative *Real-Time* TaqMan-PCR (Applied Biosystems) mit VP2-spezifischen Primern (s. Tabelle 2). Der qPCR-Lauf wurde entsprechend Tabelle 3 durchgeführt. Das TaqMan-qPCR-System basiert auf Nukleotidsonden, die an ihren Enden Reporter-Fluoreszenzfarbstoff (FAM) und Quencher (TAMRA) tragen. Die Sonde bindet komplementär an den Templatestrang und wird während der Synthese des Gegenstrangs durch die Exonukleaseaktivität der Polymerase abgebaut. Dadurch werden Fluorophor und Quencher getrennt und eine proportional zur synthetisierten DNA-Menge ansteigende Reporter-Fluoreszenz wird emittiert.

Die Proben wurden im Verhältnis 1:10, 1:100 und 1:1000 verdünnt. Zur absoluten Quantifizierung wurde das pBM20-Plasmid (Zhi et al. 2004) als Standard (0,01 - 100 pg) mitgeführt, das den gesamten kodierenden Bereich des B19V-Genoms mit intakten *inverted terminal repeats* trägt. Jede Probe wurde doppelt vermessen, um eventuelle Pipettierfehler zu korrigieren. Es wurden 96-Well-Platten und *Heat Sealing* Verschlussfolien von Peqlab verwendet. Die Reaktion erfolgte im TaqMan 7300 *Real-Time* PCR System (Applied Biosystems).

Die Konzentration der Viruspartikel wurde berechnet, indem der quantitative Wert jeder verdünnten Probe auf den Wert des Standards bezogen wurde (1 pg Plasmid-DNA entspr. $3,5 \times 10^5$ Viruspartikeln). Aus diesen Werten wurde das arithmetische Mittel gebildet.

Tabelle 2: Primer und Sonde der TaqMan-qPCR zur Bestimmung des Virustiters

Name	Sequenz 5' → 3'
VP2-FW	TGG CCC ATT TTC AAG GAA GT
VP2-RV	CTG AAG TCA TGC TTG GGT ATT TTT C
VP2-Sonde	FAM- CCG GAA GTT CCC GCT TAC AAC - TAMRA

Alle für qPCR und PCR verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG Biotech AG synthetisiert und bezogen.

- 5 µl Virus-Probe
- 0,8 µl *forward* (FW) Primer (10 pmol/µl)
- 0,8 µl *reverse* (RV) Primer (10 pmol/µl)
- 1 µl Sonde (1,5 pmol/µl)
- 4,9 µl H₂O
- 12,5 µl TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems)

Tabelle 3: qPCR-Bedingungen zur Bestimmung des Virustiters

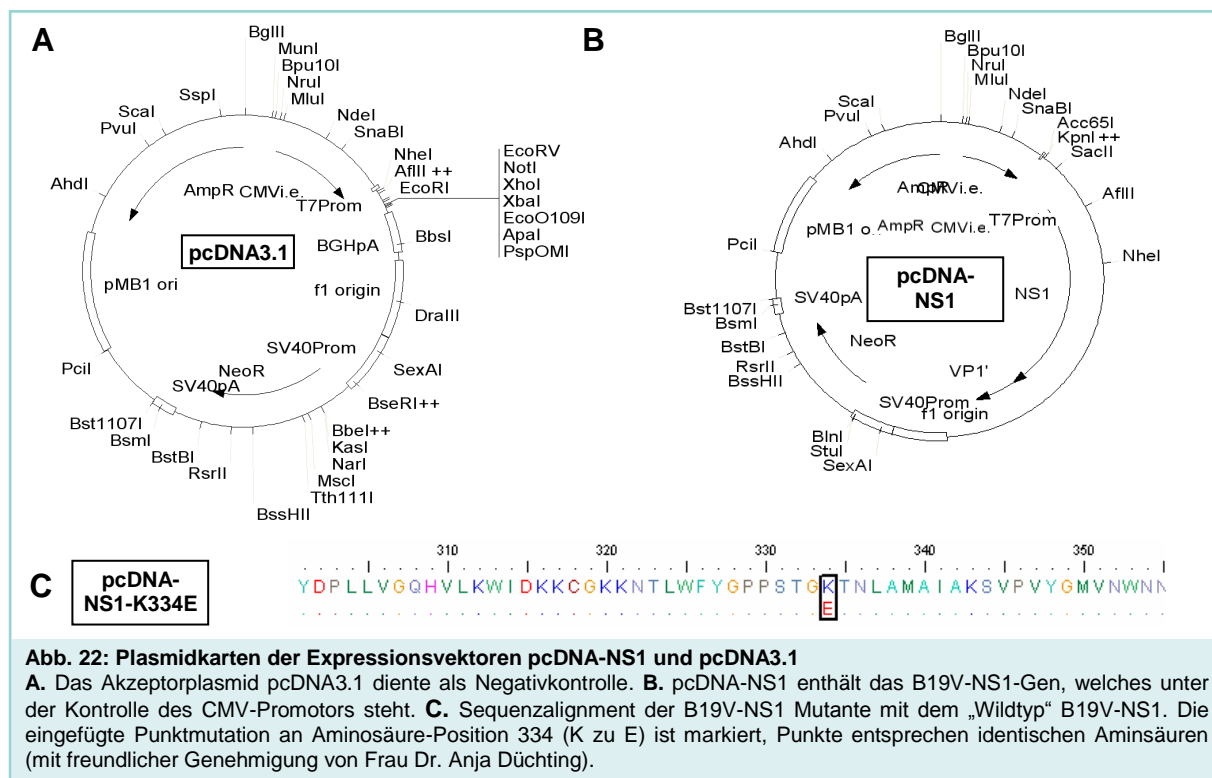
	Temperatur [°C]	Zeit [min]
initial	55	10:00
40 ×	98	0:30
	60	0:30

2.3 Zellkulturexperimente

2.3.1 Transfektion von Plasmid-DNA in adhärenente Zellen

Zur Vorbereitung der Transfektion wurden die hMEC-1-Zellen jeweils 24 h zuvor ausgesät. Das Einbringen von Plasmid-DNA in eukaryotische Zellen erfolgte mittels Nanofectin (PAA) nach Herstellerangaben. Die Methode basiert auf dem Prinzip der kationischen Nanopartikel, in deren Poren die DNA gebunden und diese über Phagozytose von den Zellen aufgenommen werden.

Zur RNA-Extraktion (s. Kap. 2.4) und für Western Blot Analysen (s. Kap. 2.7) wurden jeweils der Vektor pcDNA3.1 (s. Abb. 22A) als Kontrolle und pcDNA-NS1 (s. Abb. 22B), sowie pcDNA-NS1-K334E (s. Abb. 22C) zur Expression des parvoviralen NS1-Proteins in hMEC-1-Zellen transfiziert und die Zellen 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h sowie 96 h nach der Transfektion geerntet. Ernte der adhärenente Zelllinie hMEC-1 erfolgte durch Ablösen der Zellen mittels Trypsin (s. Kap. 2.1.1), 3 min Zentrifugation bei 1500 rpm und zweimaligem Waschen mit 1 x PBS.



2.3.2 Infektion von UT-7/EPO-Zellen mit B19V

Die Infektion mit aufgereinigten B19V-Viruspartikeln (s. Kap. 2.2) erfolgte in UT-7/EPO-Zellen. Pro 6-Well-Kulturplatte wurden $1,2 \times 10^7$ UT-7/EPO-Zellen in 6 ml IMDM-Medium (10% FCS, 1% Pen/Strep, 12 µg/ml EPO) mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 1000 mit aufgereinigten B19V-Viruspartikel infiziert (1 ml Zellsuspension pro Well).

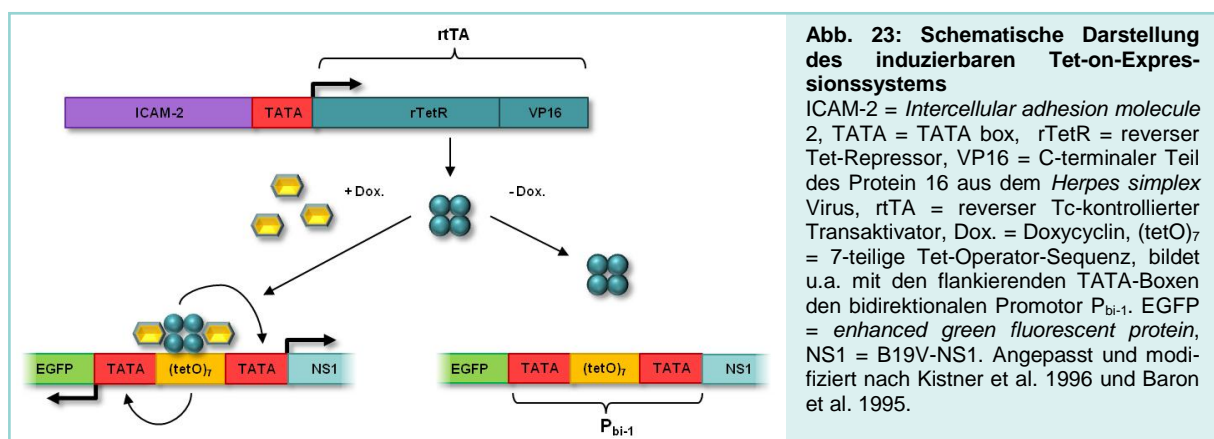
Die 6-Well Kulturplatte wurde mit Parafilm (Pechiney Plastic Packaging) versiegelt, für 2 h bei 4° C sowie für weitere 45 min bei 37° C inkubiert. Nach dieser Zeit wurde das Mediumvolumen (hMEC-1-Medium) auf 2 ml pro Well erhöht. Die Zellen wurden je nach Vorgaben des Experiments zu definierten Zeitpunkten geerntet. Die Ernte der Suspensionszelllinie UT-7/EPO erfolgte durch 3 min Zentrifugation bei 1500 rpm und zweimaligem Waschen mit 1 x PBS.

2.3.3 Konditionelle NS1-Expression in hMEC-1-Zellen

2.3.3.1 Funktionsweise des Tet (Tetracyclin)-on-Systems

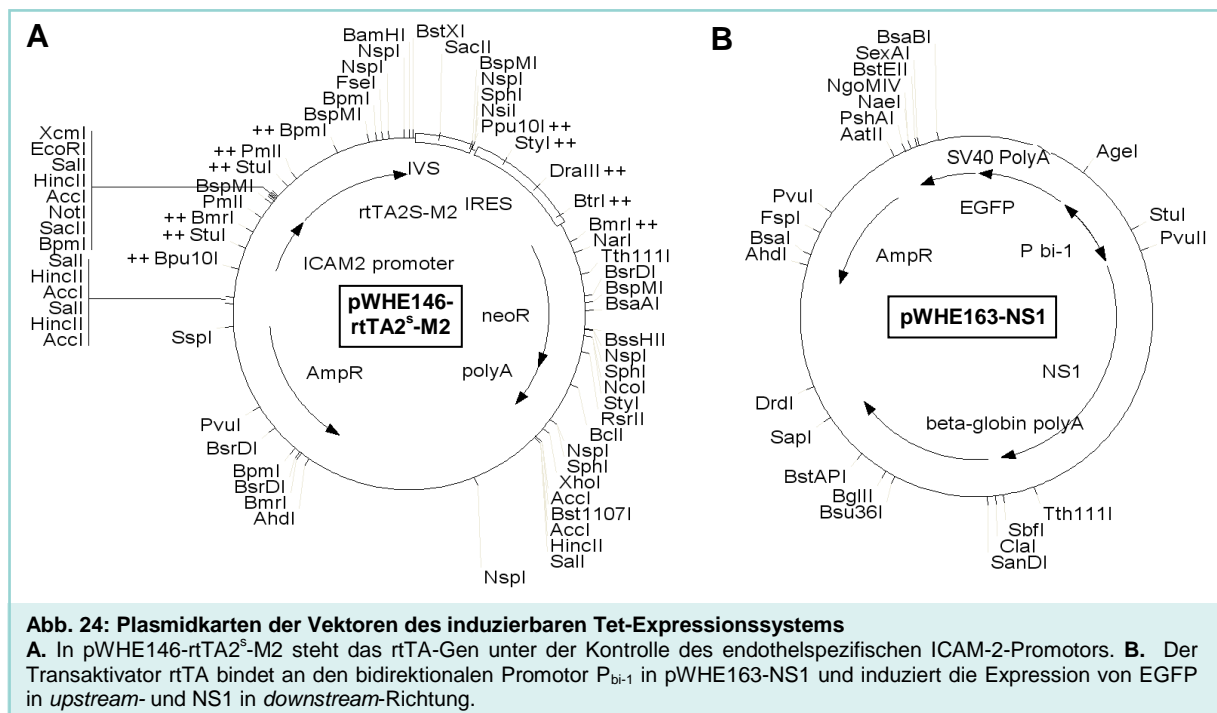
Für die kontrollierte Expression des parvoviralen NS1-Gens wurde das Tet-on-System eingesetzt (Gossen et al. 1995). Das Tet-on-System ermöglicht zudem durch die Kombination mit einem bidirektionalen Promotor eine induzierbare und parallele Expression von B19V-NS1 und dem Reportergen *Enhanced green fluorescent protein* (EGFP). Hierbei bildet der mutierte reverse Repressor des Tetracyclin-Resistenz-Operons von *Escherichia coli* und der C-terminale Bereich des Proteins 16 aus Herpes simplex ein Fusionsprotein (rtTA), das aktiviert als starker transkriptioneller Transaktivator wirkt. Die rtTA-Produktion steht unter der Kontrolle des EC-spezifischen Promotors ICAM-2, wodurch eine konstitutive Expression des Transaktivators in endotheliale hMEC-1-Zellen erreicht wird. Durch die Zugabe von Doxycyclin (ein Tetracyclinderivat) werden die rtTA-Moleküle aktiviert, binden an einen Komplex aus sieben Operator-Sequenzen (tetO; Berens und Hillen 2003), der innerhalb eines bidirektionalen Promotors (P_{bi-1} ; Baron et al. 1995, Urlinger et al. 2000) lokalisiert ist und initiieren so die Expression der Gene EGFP und B19V-NS1.

Die zwei Komponenten dieses Tet-on-Systems (s. Abb. 23) sind auf zwei verschiedenen Plasmiden lokalisiert und wurden parallel mittels Nanofectin (s.o.) in hMEC-1-Zellen transfiziert.



2 Material und Methoden

Die NS1-hMEC-Zelllinie ist durch stabile Transfektion der Vektoren pWHE163-NS1 und pWHE146-rtTA2^S-M2 (zur Verfügung gestellt von Prof. Hillen, Erlangen, s. Abb. 24) unter Selektionsdruck von 300 µg/ml Geneticin und 300 U/ml Hygromycin von Dr. Susanne Aberle (Molekulare Pathologie Tübingen) generiert und etabliert worden. Die Zellen wurden in hMEC-1-Medium (s. Kap. 2.1.1) mit Zusatz von 300 µg/ml Geneticin und 300 U/ml Hygromycin kultiviert. Durch Zugabe von 2 µg/ml Doxycyclin (Sigma) wurde die Expression von NS1 und EGFP induziert. Die Zellernte erfolgte 24 h nach Induktion.



2.4 RNA-Isolation und RT-qPCR

Zellen wurden mit Trypsin (Kulturflaschen; s. Kap. 2.1.1) bzw. mit 1 × PBS (Kulturplatten) vom Untergrund gelöst und zweimal mit 1 × PBS gewaschen. Die Gesamt-RNA wurde nach Herstellerangaben mit dem NucleoSpin RNA II (Macherey & Nagel) isoliert, wobei der DNase-Verdau auf 30 min verlängert wurde. Die RNA-Qualität und -Quantität wurden photometrisch mit Hilfe des NanoDrop (Thermo Scientific) vermessen. Hierzu wurde die Absorbtion (A) von 1 µl der unverdünnten Nukleotidlösung bei einer Wellenlänge $\lambda = 230$ nm, 260 nm und 280 nm bestimmt. Nur RNA-Proben, welche den Reinheitskriterien im Sinne von Ratio-Werten mit $A_{260}/A_{280} \geq 1,7$ und $A_{260}/A_{230} \geq 2,0$ entsprachen, wurden weiter verarbeitet.

2.4.1 DNase-Verdau

Um genomische DNA aus der RNA-Probe zu entfernen, wurde die Probe zusätzlich mit der Turbo DNase (Ambion) verdaut.

- 6 µl 10× Puffer
- 60 µl RNA-Probe (<10 µg)
- 1 µl Turbo DNase (2 U)
- 37° C, 30 min
- 2 µl 500 mM RNase-freies EDTA (Endkonz. 15 mM) hinzufügen, um DNase zu stoppen, 75° C, 10 min um DNase zu inaktivieren

2.4.2 Reverse Transkription und qPCR

2 µg Gesamt-RNA wurden mittels *High Capacity Reverse Transcription* Kit (Applied Biosystems) mit *random* Hexamer Primern nach Herstellerangaben in cDNA umgeschrieben. Die Reaktion erfolgte im Thermocycler (Pepqab) unter den Bedingungen wie in Tabelle 4 dargestellt.

- 2 µl 10× RT-Puffer
- 0,8 µl dNTP-Mix
- 2 µl *random* Primer
- 1 µl Reverse Transkriptase
- 300 ng-2 µg RNA

Tabelle 4: RT-Reaktionsbedingungen zur Bestimmung der NS1-Expression

Temperatur [° C]	Zeit [min]
25	10:00
37	120:00
85	5:00
4	∞

Tabelle 5: Primer und Sonde der TaqMan-qPCR zur Bestimmung der relativen NS1-Expression

Name	Sequenz 5' > 3'
NS1 FW	TCC CTG GAA TTA ATG CAG ATG C
NS1 RV	CAC TGC TGC TGA TAC TGG TGT CT
NS1-Sonde	FAM - ACC TCC AAA CCA CCC CAA TTG TCA CA - TAMRA
ATP FW	CAG TGA TTA TAG GCT TTC GCT CTA A
ATP RV	CAG GGC TAT TGG TTG AAT GAG TA
ATP-Sonde	FAM - AGC CCA CCT CTT ACC ACA AGG CAC A - TAMRA

Die NS1-Transkription wurde mit 2 µl cDNA in einer quantitativen *Real-Time* TaqMan-PCR quantifiziert. Thermocyclerbedingungen und Primersequenzen s. Tabelle 4 und Tabelle 5. Die Quantifizierung der VP2-Transkription erfolgte ebenso, jedoch mit den Primern aus Tabelle 2.

2.5 Auswertung der quantitativen PCR

Die Auswertung erfolgte unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode, bei der zur Berechnung die Ct-Werte („*Threshold Cycle*“-Werte) des nicht regulierten Haushaltsgens ATP-Synthase 6 von dem des untersuchten Gens, hier B19V-NS1, abgezogen werden:

$$\Delta\text{Ct} = \text{Ct}_{\text{NS1}} - \text{Ct}_{\text{ATP Synthase 6}}$$

Die beiden ΔCt -Werte der jeweiligen Gruppen (Versuch, Kontrolle) werden wiederum voneinander subtrahiert ($\Delta\Delta\text{Ct}$) und in die folgende Gleichung eingesetzt:

$$\Delta\Delta\text{Ct} = \Delta\text{Ct} (\text{Versuch}) - \Delta\text{Ct} (\text{Kontrolle})$$

Für die Änderung der Expression gilt: $2^{-\Delta\Delta\text{Ct}}$

Die Vorteile der Normalisierung liegen in der Reduzierung der Varianz der Expressionsergebnisse, da unterschiedliche RNA-Extraktionseffizienzen sowie Fehler bei der reversen Transkription innerhalb einer experimentellen Probe gleichermaßen das Zielgen und das Haushaltsgen betreffen.

2.6 Genexpressions-Analysen

2.6.1 MAPK Signaling Pathway RT² Profiler PCR Array-Analysen

Zur Identifizierung der durch B19V-NS1 regulierten Gene der MAPK-Signaltransduktion wurde eine Genexpressions-Analyse mit Hilfe des *RT² Profiler PCR Arrays* (PAHS-A61, Qiagen) durchgeführt. Dieser PCR-basierte Array analysiert die Expression von 84 Genen des MAPK-Wegs (s. Tabelle 22, Anhang). Er umfasst Mitglieder der MAPKKK, MAPKK und MAPK-Familien, Transkriptionsfaktoren, deren Expression durch MAPK induziert werden, Raf-regulierte und MEKK1-interagierende Proteine sowie mit dem ERK1/2 (p44/42)-Signalweg assoziierte Zellzyklus-Proteine.

Die Methode beruht auf dem Prinzip der *Real-Time* PCR unter Verwendung von *Sybr Green*. hMEC-NS1-Zellen wurden mit Doxycyclin induziert (s. Kap. 2.3.3.1) und nach 24 h geerntet. Die RNA dieser Zellen und die von hMEC-1-Kontrollzellen wurden wie unter Kap. 2.4 beschrieben isoliert und bezüglich ihrer Reinheit und Qualität durch photometrische Messung (s. Kap. 2.4) und eine RNA-Agarosegelelektrophorese beurteilt.

2.6.1.1 Agarosegelelektrophorese für RNA

Sämtliche verwendeten Geräte wurden (falls möglich) bei 180° C für 4 h gebacken oder mit Protector RNase Inhibitor (Roche) behandelt. Es wurden RNase-freie Agarose und autoklavierter TAE-Puffer (s. Kap. 2.8.1.1.2) verwendet. Je 2 µg RNA wurde mit RNase-freiem Wasser und 5 x RNA-Ladepuffer (s.u.) vermischt und für 10 min bei 68° C inkubiert, um Sekundärstrukturen aufzulösen. Die Elektrophorese fand bei 100 V für 45 min statt. Intakte Gesamt-RNA wies immer zwei klar sichtbaren Banden der rRNA-Spezies 18 s und 28 s auf, bei hohen RNA-Konzentrationen auch die Bande der 5s-rRNA.

5 x RNA-Ladepuffer

- 16 µl Bromphenolblau (gesättigte Lösung, Sigma)
- 80 µl 500 mM EDTA (Roth)
- 720 µl 37 % Formaldehyd (Roth)
- 2 ml 100 % Glycerol (Roth)
- 2,085 ml Formamid (Merck)
- 4 ml 10x MOPS (Sigma)
- Ad 10 ml mit RNase-freiem Wasser

2.6.1.2 Reverse Transkription und Real-Time-PCR

Zur Konzentrierung und weiteren Reinigung der RNA-Proben wurde das RNeasy MiniElute Cleanup Kit (Qiagen) eingesetzt. Als nächster Schritt folgte die reverse Transkription von 800 ng RNA in cDNA mit dem *RT² PCR Array First Strand Kit* (Qiagen). Für die Durchführung der *Real-Time* PCR Array-Analyse wurde die cDNA mit dem SuperArray PCR Master Mix (Qiagen, nach Herstellerangaben) und RNase-freiem Wasser vermischt und jeweils 25 µl in jedes *Well* der 96-*Well* Platte des *RT² Profiler PCR Arrays* pipettiert. Die *Real-Time* PCR inkl. Schmelzkurvenanalyse wurde mit dem TaqMan-Programm in Tabelle 6 durchgeführt.

Tabelle 6: qPCR-Bedingungen für die Durchführung des Profiler-Arrays

	Temperatur [°C]	Zeit [min]
initial	55	2:00
	95	10:00
45 x	95	00:15
	60	1:00
Schmelzkurvenanalyse	95	1:00
	65	2:00
	65 - 95	2° C/min

2 Material und Methoden

Die Auswertung des *RT² Profiler PCR Arrays* erfolgte unter Anwendung der $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (S. Kap. 2.5). Zur Normalisierung wurden mehrere Haushalts-Gene (Hypoxanthin-Phosphoribosyltransferase 1, Ribosomales Protein L13a, Glycerinaldehyd-3-Phosphate-Dehydrogenase, β -Aktin) verwendet. Die Auswertung erfolgte online über das Programm *RT² Profiler PCR Array Data Analysis v3.4* der Qiagen-Homepage (<http://pcrdataanalysis.sabiosciences.com/pcr/arrayanalysis.php>). Um eine statistisch signifikante Aussage treffen zu können, wurde der *RT² Profiler PCR MAPK Array* mit je drei Ansätzen der hMEC-NS1-Zellen und der hMEC-1-Kontrollzellen durchgeführt.

2.6.2 Analyse der eNOS-Signalgebung mittels TaqMan Array

Zur Identifizierung der durch B19-NS1 regulierten Gene der eNOS-Signaltransduktion wurde eine Genexpressions-Analyse mit Hilfe des *Real Time TaqMan PCR-Array* (Applied Biosystems) durchgeführt. Dieser PCR-basierte Array analysiert die Expression von 92 Genen des eNOS-Wegs (s. Tabelle 23, Anhang). Er umfasst Mitglieder der Zellzykluskontrolle, der Apoptose (Caspasen) sowie Gene von Proteinen und Enzymen verschiedener Signalwege, die mit eNOS interagieren, wie beispielsweise G-Proteine, Interleukine oder Bestandteile des Akt-Signalwegs.

Die Methode beruht auf dem Prinzip der *Real-Time TaqMan PCR*. hMEC-NS1-Zellen wurden mit Doxycyclin induziert (s. Kap. 2.3.3) und nach 24 h geerntet. Die RNA dieser Zellen und die von hMEC-1 Zellen wurden wie unter Kap. 2.4 beschrieben isoliert und bezüglich ihrer Reinheit und Qualität durch photometrische Messung und RNA-Agarosegelelektrophorese beurteilt. Konzentration und Reinigung erfolgte wie zuvor beschrieben (Kap. 2.6.1.2). Zur cDNA-Synthese wurde das *High Capacity Reverse Transcription* Kit nach Herstellerangaben verwendet. Die Proben für die TaqMan-PCR wurden gemäß dem Herstellerprotokoll und unter Verwendung des TaqMan Universal Master Mix angesetzt.

Die Auswertung erfolgte über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode (s. Kap. 2.5) unter Zuhilfenahme der DataAssist™-Software v3.0 (Applied Biosystems). Um eine statistisch signifikante Aussage treffen zu können, wurde der eNOS *Real Time TaqMan PCR-Array* mit je drei Ansätzen der hMEC-NS1-Zellen und der hMEC-1-Kontrollzellen durchgeführt.

2.7 Proteinanalysen

2.7.1 Zellyse und Konzentrationsbestimmung

hMEC-1- und UT-7/EPO-Zellen aus einer 6-Well-Kulturplatte wurden entsprechend des Protokolls in Kap. 2.4 geerntet, pro Well mit in 100 μl frisch angesetztem CCLB (s.u.)

resuspendiert und für 2 h auf Eis lysiert. Die Zelltrümmer wurden auf 4° C für 10 min bei 10.000 rpm abzentrifugiert.

2 × Cell Lysis Buffer (CLB)

- 2,4 g Trizma base (Sigma)
- 8,8 g NaCl
- 2 ml 0,5 M EDTA
- 10 ml Triton-X100 (Merck)
- 100 ml Glycerol (Roth)

1 × Complete Cell Lysis Buffer (CCLB)

- 2,5 ml 2 × CLB
- 50 µl 100 mM Natriumorthovanadat (1 mM; Sigma)
- 5 µl 100 mM Natriummolybdat (100 nM; Sigma)
- 5 µl 1 M DTT (1 mM; Sigma)
- 5 µl 1 M β-Glycerophosphat (10 mM; Sigma)
- 1 ml 50 mM Natriumfluorid (10 mM; Sigma)
- 500 µl Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette in 1 ml CLB gelöst; Roche)
- Ad 5 ml sterile dH₂O

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bradford-Assay wurde 200 µl Bio-Rad Protein Assay-Lösung (BioRad) im Verhältnis 1:5 mit dH₂O gemischt, je 1 ml dieser Lösung auf 1 ml-Küvetten (Sarstedt AG & KO) verteilt, 1 µl Proteinlösung hinzugefügt, gründlich gemischt und 2 min inkubiert. Jede Probe wurde in dreifacher Ausführung bei einer Wellenlänge von $\lambda = 600$ nm spektrometrisch vermessen. Die Absorption A_{600} wurde mit einer vorher erstellten Standardkurve (BioRad Protein Assay Standard II; 0,5-10 µg/µl) verglichen.

2.7.2 Herstellung der Positivkontrollen für Western Blot-Experimente

2.7.2.1 Phospho-p44/42-ERK

hMEC-1-Zellen wurden über Nacht in FCS-reduziertem hMEC-1-Medium (1 %; s. Kap. 2.1) kultiviert. Das Medium wurde entfernt und durch hMEC-1-Medium mit 30 % FCS ersetzt. Nach einer Inkubation von 45 min wurden die Zellen geerntet und wie in Kap. 2.7.1 beschrieben lysiert und vermessen.

2.7.2.2 Phospho-p38-MAPK

hMEC-1-Zellen wurden über Nacht in FCS-reduziertem Medium (1 %; s. Kap. 2.1) kultiviert. Das Medium wurde abgenommen. Die Zellen wurden in einem UV-Crosslinker für 1 min bei 256 nm bestrahlt. Anschließend wurden sie mit normalem hMEC-1-Medium bedeckt, für 30 min inkubiert und anschließend geerntet und wie in Kap. 2.7.1 beschrieben lysiert und vermessen.

2.7.3 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Alle Proteinproben wurden in einem denaturierenden Acrylamid-Gel nach ihrer Molekülmasse elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde nach dem Pippetierschema in Tabelle 7 angefertigt. Die Acrylamid-Konzentration des Trenngels betrug 12 %. Das Trenngel wurde mit Isopropanol überschichtet, um die Oberfläche zu glätten. Dies wurde vor Aufgießen des Sammelgels dekantiert.

Die Proteinproben wurden mit 1/5 Vol. 5 × Lämmli-Puffer (s.u.) versetzt und 3 min bei 95° C denaturiert. Je Spur wurden 30 µg Proteinlösung auf das Gel geladen. Als Größenstandard diente der *PageRuler Plus Prestained Protein Ladder* (s. Abb. 25; Fermentas). Die Acrylamid-Gele wurde mit Elektrodenpuffer (s.u.) überschichtet. Die Elektrophorese wurde mit 200V und 60 mA je Gel für 90 min durchgeführt.

5 × Lämmli-Puffer

- 312 mM Trizma base pH6,8 (Sigma)
- 10 % SDS (Applichem)
- 50 % Glyzerol
- 25 % β-Mercaptoethanol (Sigma)
- 0,005 % Bromphenolblau (Sigma)

10 × Elektrodenpuffer

- 250 mM Tris HCl, pH8,6
- 2 M Glycin (Roth)
- Autoklavieren
- Vor Gebrauch 1:10 verdünnen und 0,1 % SDS hinzufügen

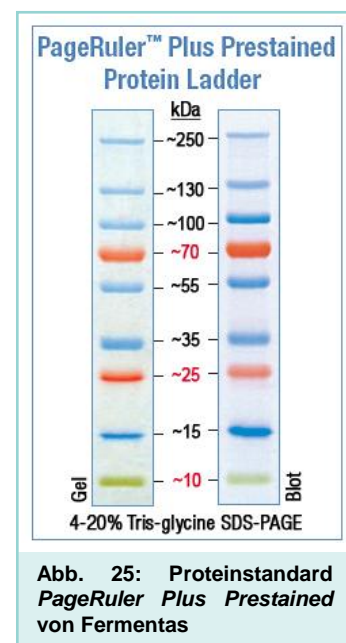


Abb. 25: Proteinstandard *PageRuler Plus Prestained* von Fermentas

Tabelle 7: SDS-Polyacrylamid-Gele

	Sammelgel	Trenngel
Acrylamid-Konzentration	4 %	12 %
MW –Bereich [kDa]		14- 80
30% Acrylamid (Roth)	0,67 ml	4 ml
1,5 M Tris pH8,8	-	2,5 ml
1 M Tris pH6,8	0,5 ml	-
H ₂ O	2,4 ml	3,4 ml
10% SDS	40 µl	100 µl
10% APS (Sigma)	30 µl	50 µl
TEMED (Roth)	6 µl	10 µl

2.7.4 Semi-dry Westernblot

Nach der Auftrennung in der SDS-PAGE wurden die Proteine aus den Polyacrylamid-Gelen auf PVDF-Membranen (Perkin Elmer) transferiert. Hierzu wurde die Bindefähigkeit der PVDF-Membran nach dem Zuschnitt (5,5 × 8,5 cm) für 30 s in Methanol (VWR) aktiviert. Drei Lagen Whatman-Papier (Whatman; 5,5 × 8,5 cm, mit *Blotting*-Puffer (s.u) befeuchtet), die PVDF-Membran, das Polyacrylamid-Gel und erneut drei Lagen feuchtes Whatman-Papier wurden in einer Blotkammer aufeinander gestapelt. Der elektrische Transfer wurde bei 25 V und 90 mA je Gel in 75 min vollzogen. Der vollständige Transfer wurde durch Färben des Gels mit Coomassie-Lösung (s.u.; 15 min färben, 20 min entfärben mit 10 % Essigsäure) überprüft.

Blotting-Puffer

- 39 mM Glycin
- 48 mM Tris-HCl, pH8,3
- 0,037 % SDS
- 20% Methanol

Coomassie-Lösung

- 40 % Methanol
- 10 % Essigsäure (Merck)
- 49,9 % Wasser
- 0,1 % Coomassie Brilliant Blue R250 (Roth)

2.7.5 Spezifische Immunreaktion

Alle folgenden Schritte wurden in einem 50 ml Falcon-Tube durchgeführt. Zum spezifischen Nachweis der Proteine wurden nach dem *Semi-dry* Westernblot die freien Proteinbindestellen auf der PVDF-Membran durch eine 60-minütige Inkubation mit 5 % BSA (*Bovine serum albumine*, Ablumin Fraktion V, Roth) in TBSTw (s.u.; 0,1 % Tween-20; Sigma) bei RT auf dem Rollenmischer blockiert. Die Inkubation mit dem ersten Antikörper erfolgte über Nacht bei 4° C oder 2 h bei RT. Der Primärantikörper wurde gemäß Tabelle 8 in 5 % BSA in TBSTw verdünnt.

Nach der Inkubation des Primärantikörpers folgte ein Waschschrift mit 3 × 10 min mit TBSTw (sämtliche folgenden Waschschrift wurden auf dieselbe Weise durchgeführt). Dann wurde der Meerrettichperoxidase (HRP)-gekoppelte Sekundärantikörper (Verdünnung 1:3000 in 5 % BSA in TBSTw) für 1 h bei RT mit der Membran inkubiert, gefolgt von einem erneuten Waschschrift.

10 × TBS

- 0,5 M Trizma base
- 1,5 M NaCl
- in dH₂O lösen
- pH 8,0 mit HCl einstellen
- vor Gebrauch 1:10 mit dH₂O verdünnen

Tabelle 8: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper

Antikörper	Wirtstier	Verdünnung	Hersteller
Primär-Antikörper			
<i>Anti-p44/42-ERK</i>	Kaninchen	1:1000	Cell signaling
<i>Anti-pp44/42-ERK</i>	Maus	1:2000	Cell signaling
<i>Anti-p38-MAPK</i>	Hase	1:750	Cell signaling
<i>Anti-pp38-MAPK</i>	Hase	1:1000	Cell signaling
<i>Anti-GAPDH-HRP</i>	Ziege	1:1000	Santa Cruz
<i>Anti-FLAG M2</i>	Maus	1:750	Stratagene
Sekundär-Antikörper			
Anti-Maus HRP	Ziege	1:3000	Dianova
Anti-Kaninchen HRP	Ziege	1:3000	Dianova

Die Detektion der antikörpermarkierten Proteine erfolgte über eine Chemilumineszenzreaktion. Die Membran wurde mit Elektrochemilumineszenz-Lösungen (*Pierce ECL Western Blotting Substrate*, Thermo) 1 min inkubiert und in Folie flach ausgelegt. Die Visualisierung und Aufzeichnung der Signale geschah über einen Chemilumineszenz-Röntgenfilm (GE Healthcare).

2.7.6 Entfernen gebundener Antikörper (*Stripping*)

Um die Rehybridisierung eines weiteren Antikörpers auf der Membran zu ermöglichen, wurde der erste Antikörper entfernt. Die Membranen wurden 30 s in 100% Methanol aktiviert, gewaschen, 15 min mit 5 ml *Restore PLUS Western Blot Stripping Buffer* (Thermo) bei RT auf einem Rollenmischer inkubiert und anschließend erneut gewaschen (s. Kap. 2.7.5). Nach dem *Stripping* wurde wie in Kap. 2.7.5 beschrieben mit der Blockierung der Membran fortgeföhren.

2.7.7 Auswertung der Western Blot Analysen

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Analysen wurde mit der Software ImageJ v1.45s durchgeführt. Für statistische Daten wurden pro Experiment mindestens drei repräsentative Western Blot Assays ausgewertet. Alle Proteinsignale wurden zuerst anhand der Expression des Haushaltsgens GAPDH normalisiert. Anschließend erfolgte die Bildung der Ratio aus Phosphoprotein und Gesamtprotein (z.B. phospho-p38/p38). Die x-fache Regulation wurde durch den Vergleich mit der Negativkontrolle bestimmt.

2.8 Identifizierung der Proteininteraktion von B19V-NS1

Um ein Protein gezielt isolieren zu können, ist es von Vorteil, dieses mit einer Markierung zu versehen, um es vom Proteom einer Zelle unterscheiden zu können. Diese Markierung ermöglicht es, das gesuchte Protein mit interagierenden Proteinen aus eukaryotischen Zellen zu gewinnen (Munday et al. 2012). Das hier verwendete System basiert auf der Expression des Proteins von Interesse B19V-NS1 in Verbindung mit einem N- oder C-terminal fusionierten *FLAG-Tag* (n-DYKDDDDK-c, 1012 Da). Bei der Proteinfaltung kann es vorkommen, dass eine Epitopmarkierung wie *FLAG* nicht an der Oberfläche des Proteins lokalisiert ist. Obwohl das *FLAG-Tag* hydrophile Eigenschaften aufweist (Terpe 2003) und daher tendenziell eher an der Proteinoberfläche lokalisiert sein sollte, wurden sicherheitshalber zwei Zelllinien generiert, die das B19V-NS1-Fusionsprotein mit je C- oder N-terminaler *FLAG*-Markierung exprimieren. Das sollte sicherstellen, dass das Fusions-*Tag* in mindestens

2 Material und Methoden

einer Proteinvariante gegenüber der Proteinoberfläche exponiert und so die antikörpervermittelte Aufreinigung möglich ist. Durch Verwendung einer Negativkontrolle in Form von Zellen, die nur *FLAG* exprimieren, kann der Hintergrund an kontaminierenden Proteinen identifiziert werden, die unspezifisch an das Fusions-Tag und/oder die Affinitätsmatrix der Immunpräzipitation binden. Das markierte Protein wird mit Hilfe des Tags aus der Zelle isoliert, wobei gebundene Interaktionspartner kopräzipitieren. Das aufgereinigte Produkt und die daran gebundenen Proteine werden anschließend massenspektrometrisch charakterisiert.

Zunächst wurden die Expressionsvektoren pcDNA-NS1-FLAG, pcDNA-FLAG-NS1 und pcDNA-FLAG kloniert. Die NS1-Konstrukte wurden jeweils stabil in endotheliale Zellen (hMEC-1) transfiziert, um ausreichende Mengen an Proteinen zu erhalten. Das Kontrollplasmid pcDNA-FLAG wurde transient in hMEC-1-Zellen transfiziert. Das Vorhandensein der transfizierten Plasmid-DNA und die Expression des gewünschten FLAG-Produkts (FLAG, NS1-FLAG und FLAG-NS1) wurden kontrolliert. In den beiden Zelllinien, die *FLAG*-fusioniertes NS1 exprimierten, wurde das gesamte Proteom mit ¹³C-isotopischem L-Arginin bzw. L-Lysin markiert (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture* = SILAC). Über eine antikörpervermittelte Aufreinigungsmethode wurden alle *FLAG*-fusionierten Proteine sowie deren Interaktionspartner aus dem Gesamtzelllysat isoliert. Die resultierende Proteinmischung wurde tryptisch verdaut und die erhaltenden Proteinextrakte mittels LC-MS/MS analysiert.

2.8.1 Generierung von Expressionsplasmiden mit *FLAG*-markiertem B19V-NS1

Parvovirale DNA wurde aus dem Nabelschnurgewebe eines *Hydrops fetalis* isoliert, das NS1-Gen mittels PCR amplifiziert und über die Vektoren pGEM und pcDNA3.1 in pCTAP-NS1 kloniert. Frau Dr. Anja Düchting (Molekulare Pathologie Tübingen) stellte mir dieses Plasmid freundlicherweise zur Verfügung.

2.8.1.1 Klonierung von pcDNA-FLAG-NS1

2.8.1.1.1 Gradienten-PCR

Für die Klonierung von B19V-NS1 mit N-terminalem *FLAG*-Tag wurde die NS1-Region aus pCTAP-NS1 (s. Kap. 2.8.1) mittels PCR amplifiziert. Gleichzeitig wurden Restriktionsschnittstellen für das Enzym *Mlu* I (s. Tabelle 10, fett) über Primersequenzen eingefügt. Um diese spezifischen Primer zu etablieren, wurde eine Gradienten-PCR mit Velocity DNA Polymerase von Bionline nach unten stehendem Pipettierschema durchgeführt. Dabei variierte die

Annealing-Temperatur graduell von 55° C bis 65° C (s. Tabelle 9). Die Kontrolle auf einem Agarosegel (s. Kap. 2.8.1.1.2) zeigte die größte Produktausbeute bei 56 - 59,5° C. Die aus den Ansätzen resultierenden Produkte wurden vereint und mit dem Nucleo Spin Extract II Kit (Macherey und Nagel) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Mit dem gereinigten Produkt wurde in Kap. 2.8.1.1.3 weiter verfahren.

- 5,0 µl 10x Puffer
- 0,3 µl dNTPs (25mM)
- 1,0 µl FW Primer (10 pmol/µl)
- 1,0 µl RV Primer (10 pmol/µl)
- 0,5 µl *Velocity* DNA Polymerase (1,25 U, Biorline)
- 500 ng Template-DNA
- Ad 50 µl H₂O

	Temperatur [°C]	Zeit [min]
initial	98	2:00
35 x	98	0:30
	55-65	0:30
	72	0:40
	72	4:00
	4	∞

Tabelle 9: Bedingungen der Gradienten-PCR zur Etablierung der *Mlu*-Schnittstellenprimer für die Klonierung von pEF-FLAG-NS1

Tabelle 10: Primer für die Klonierung von pEF-FLAG-NS1

Name	Sequenz 5' > 3'	T _m [°C]
pFLAG-NS1 <i>Mlu</i> FW	AACT ACG CGT ATG GAG CTA TTT AGA GG	63,1
pFLAG-NS1 <i>Mlu</i> RV	AGCT ACG CGT TTA CCT CAT AAT CTA CAA	64,0

2.8.1.1.2 Agarosegelelektrophorese für DNA

1 - 2 % Agarose (Biozym) wurden in 1 x TAE-Puffer (s.u.) aufgeschwemmt und im Mikrowellenherd gekocht, bis die Agarose vollständig gelöst war. Die Flüssigkeit wurde mit Ethidiumbromid (10 µg/ml) versetzt, in den vorbereiteten horizontalen Gelträger eingefüllt, Gelkämme eingesteckt und das Gel erstarren gelassen. Die DNA-Proben wurden mit Ladepuffer (Fermentas) vermischt. 3 µl pUC Mix Marker 8 (Fragmente < 1000 bp; Fermentas) bzw. pUC Mix Marker 4 (Fragmente > 1000 bp; Fermentas) dienten als Längenmarker. Die Elektrophorese fand bei 100 - 120 V und 2 A für 35 - 50 min statt.

2 Material und Methoden

50× TAE

- 2 M Trizma base
- 50 mM EDTA, pH 8,0 (Roth)
- 250 mM Na-Acetat (Roth)
- 57,1 ml Essigsäure (Merck)
- Ad 1000 ml dH₂O

2.8.1.1.3 Restriktionsverdau und Ligation

Das gereinigte PCR-Produkt (Kap. 2.8.1.1.1) sowie der Zielvektor pEF-FLAG (s. Abb. 26; Starr et al. 1997, Vektor ohne SOCS3) wurden mit *Mlu* I (Fermentas, 10 U/μg DNA; gleichermaßen in allen folgenden Restriktionsverdau) 2 h bei 37° C verdaut. Vektor und Insert wurden erneut aufgereinigt (s. Kap. 2.8.1.1.1), der Vektor dephosphoryliert (*Shrimp Alkaline Phosphatase*, Roche, Protokoll nach Herstellerangaben) und beide DNA-Fragmente mit T4-Ligase (Fermentas) im molaren Mengenverhältnis Vektor zu Insert 1:15 über Nacht bei 4° C ligiert. Das Konstrukt wurde in chemisch kompetente *E.coli*-Zellen des Stammes HB101 (Promega) transformiert (10 min auftauen, 1 μl Ligationsansatz hinzugeben, 5 min auf Eis inkubieren, 40 s bei 42° C hitzeschocken, 2 min auf Eis). Die Bakterien wurden 1 h bei 37° C in SOC-Medium (s.u.) schüttelnd inkubiert, auf LB-Ampicillin-Agarplatten (s.u.; 30 μg/ml Ampicillin) ausgestrichen und über Nacht bei 37° C bebrütet.

1730	TCGTGAGG	<i>Eco</i> R I	GAA TTC	<i>Xba</i> I	CTAGACT	<i>Spe</i> I	AGT	GCTAGCC	ACC	<i>Asc</i> I	ATGGCGC	
1770	GCC	<i>Mlu</i> I	AAGGACTA	CAAGGACGAC	GATGACAAGA	CGCGT	TAATA					
			FLAG									
1810	GCTAGC	<i>Spe</i> I	ACTA	<i>Xba</i> I	GTCTAGAG	TG	AGGGTCCCCA	CCTGGGACCC				
1850	TTGAGAGTAT		CAGGTC									

Abb. 26: Multiple Cloning Site des Vektors pEF-FLAG
Der 18 nt Kodierungsbereich des *FLAG*-Tags wird von mehreren Restriktionsschnittstellen flankiert. Für die N-terminale *FLAG*-Markierung von NS1 wurde die *Mlu* I-Schnittstelle verwendet. Die Transkription des Produkts startet an Position 1763 des Vektors pEF-FLAG (rot unterlegt). Für die Klonierung an den C-Terminus von NS1 wurde die erste *Xba* I-Schnittstelle verwendet. Hier beginnt die Transkription am Startcodon von NS1 (hier nicht gezeigt).

SOC-Medium

- 0,5 % Hefeextrakt (Roth)
- 0,05 % NaCl
- 2,5 mM KCl
- 10 mM MgCl₂ (Merck)
- 10 mM MgSO₄ (Sigma)
- Mit H₂O ad 900 ml, pH 7 mit 10 M NaOH einstellen, autoklavieren, abkühlen lassen
- 20 mM Glucose (Sigma)

LB-Medium/LB-Agar (*lysogeny broth*)

- 1 % Trypton (BD)
- 0,5 % Hefeextrakt
- 1 % NaCl
- pH 7,5 mit NaOH (Merck) einstellen
- für LB-Agar: zusätzlich 15 g/l Agarose (Difco)

2.8.1.1.4 Selektion der Klone

Nach der Transformation gewachsene Bakterienkolonien (Kap. 2.8.1.1.3) wurden gepickt und über Nacht in 3 ml LB-Ampicillin-Medium bei 37° C schüttelnd inkubiert. Aus 2 ml der Bakteriensuspension wurden mit dem Plasmid Mini Kit I (Omega bio-tek) die Plasmid-DNA präpariert. 1 ml der Bakteriensuspension wurde für weitere Expansion bei 4° C aufbewahrt. Um auf Vorhandensein und Orientierung des NS1-Inserts zu testen, wurde die isolierte Plasmid-DNA der Klone in einer PCR eingesetzt. Hierbei wurden drei Primer verwendet (Tabelle 12), die je nach Orientierung des Inserts ein unterschiedlich großes PCR-Produkt generierten (s. Abb. 27). Die PCR wurde nach den PCR-Bedingungen in Tabelle 11 vollzogen und deren Ergebnis auf einem Agarosegel bewertet.

Tabelle 11: PCR-Bedingungen zur Amplifikation von isolierter DNA

	Temperatur [° C]	Zeit [min]
initial	95	2:00
35 x	95	0:30
	siehe jeweilige Primertabelle	0:30
	72	1:00
	72	2:00
	4	∞

Tabelle 12: Primer zur Bestimmung der Insert-Ausrichtung mittels PCR

Name	Sequenz 5' > 3'	T _m [° C]
FLAG-sense	GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG	60,6
NS-18	TTC CTG TAC TTG GCG GCC	59,1
NS-39	GAA ATT TCG AGA ATT TAC CCC A	58,2

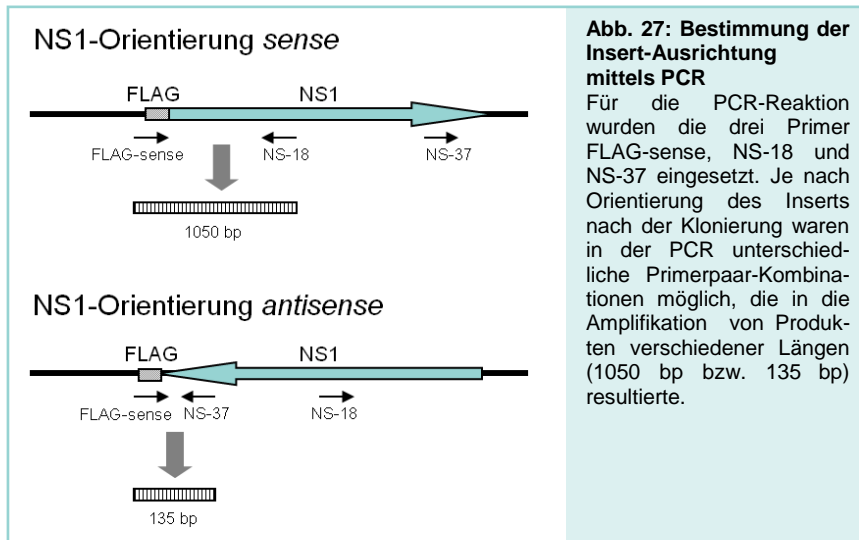


Abb. 27: Bestimmung der Insert-Ausrichtung mittels PCR

Für die PCR-Reaktion wurden die drei Primer FLAG-sense, NS-18 und NS-37 eingesetzt. Je nach Orientierung des Inserts nach der Klonierung waren in der PCR unterschiedliche Primerpaar-Kombinationen möglich, die in die Amplifikation von Produkten verschiedener Längen (1050 bp bzw. 135 bp) resultierte.

2.8.1.2 Klonierung von pcDNA-NS1-FLAG

2.8.1.2.1 Gerichtete Mutagenese

Für die Klonierung von NS1 mit C-terminal fusioniertem *FLAG-Tag* in den Vektor pEF-FLAG war es notwendig, die zweite *Xba I*-Schnittstellen (s. Abb. 26) funktionsunfähig zu mutieren (= *Xba**), da die Klonierung nur über diese Schnittstelle vollzogen werden konnte und ein Restriktionsverdau von pEF-FLAG mit *Xba I* den gesamten FLAG-Bereich entfernen würde.

	Temperatur [°C]	Zeit [min]
intial	98	3:00
35/25 x	98	0:30
	55	0:30
	72	0:10/0:15
	72	5:00
	4	∞

Tabelle 13: Bedingungen der PCRs zur gerichteten Mutagenese der *Xba I*-Schnittstelle in pEF-FLAG

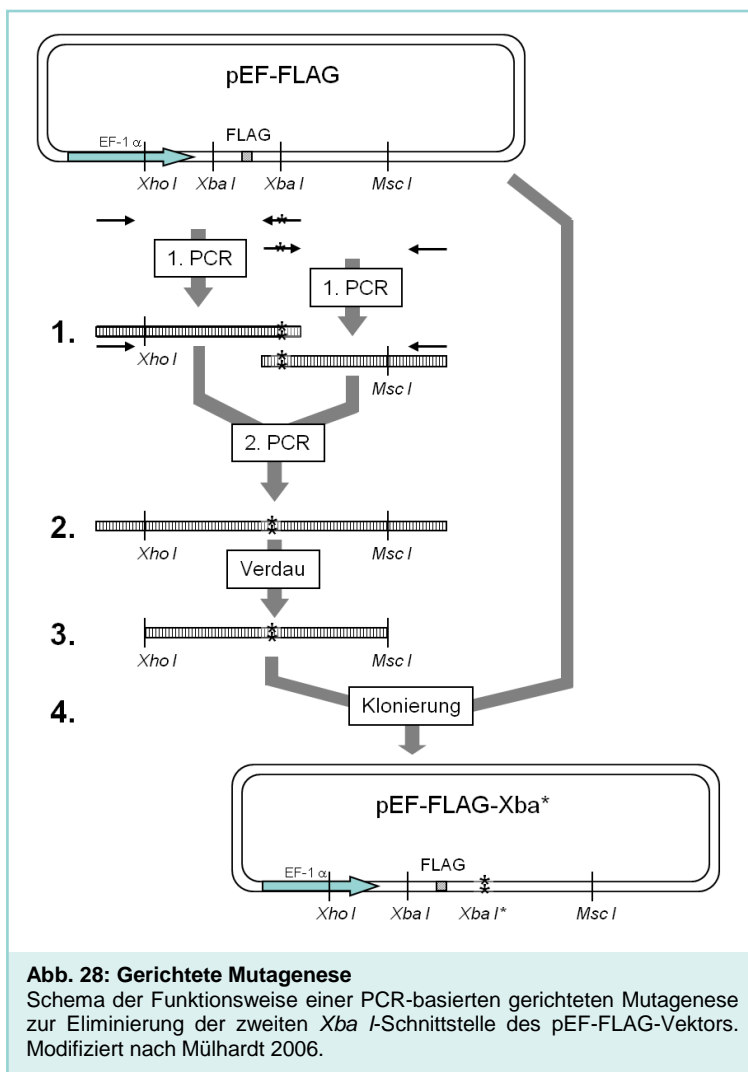
Tabelle 14: Primer für die gerichtete Mutagenese von pEF-FLAG

Name	Sequenz 5' > 3'	T _m [°C]
pEF- <i>Xba*</i> FW1	CCA GGC ACC TCG ATT AGT TC	57,2
pEF- <i>Xba*</i> RV1	GGA CCC TCA CTC AAG ACT AGT	52,24
pEF- <i>Xba*</i> FW2	ACT AGT CTT GAG TGA GGG TCC	52,24
pEF- <i>Xba*</i> RV2	AGA TTC CCC AGC AAA TTC GT	58,69

Für die eingesetzte Methode zur gerichteten Mutagenese (Mülhardt 2006, s. Abb. 28) wurden komplementäre Primer (pEF-*Xba** RV1 und -FW2) verwendet, die die gewünschte Mutation der zweiten *Xba I*-Schnittstelle trugen (s. Tabelle 14, fett). Je ein *upstream* bzw. *downstream* gelegener Primer (pEF-*Xba** FW1, pEF-*Xba** RV2; s. Tabelle 14) wurde generiert, dessen Positionierung so gewählt wurde, dass jeweils eine weitere Restriktionsschnittstelle

(*Xho I*, *Msc I*) mit eingeschlossen wurde. Je Primerpaar wurde eine PCR nach den Bedingungen in Tabelle 13 vollzogen und resultierte in zwei kurzen Produkten (vgl. Abb. 28 „1.“, 295 bp und 335 bp).

Nach der ersten PCR wurden die zwei kurzen PCR-Produkte aufgereinigt (s. Kap. 2.8.1.1.1) und zusammen mit den flankierenden Primern (pEF-*Xba** FW1 und -RV2) in einer zweiten PCR verwendet (vgl. Abb. 28 „2.“). Das resultierende lange Amplifikat (vgl. Abb. 28 „3.“; 630 bp) wurde aufgereinigt (s. Kap. 2.8.1.1.1) und zusammen mit dem Zielvektor pEF-FLAG mit *Xho I* und *Msc I* verdaut. Beide Produkte des enzymatischen Verdaus wurden mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt, das Fragment der richtigen Größe wurde ausgeschnitten und die DNA extrahiert. Ligation (1:6; vgl. Abb. 28 „4.“), Transformation und Minipräparation der Plasmid-DNA von pEF-FLAG-*Xba** s. Kap. 2.8.1.1.3 und 2.8.1.1.4.



Die Plasmid-DNA der pEF-FLAG-*Xba**-Klone wurde mit *Xba I* verdaut um festzustellen, ob die zweite *Xba I*-Restriktionsschnittstelle erfolgreich mutiert war. Das Ergebnis des Verdaus wurde mittels Agarosegelelektrophorese überprüft.

2 Material und Methoden

NS1-DNA wurde aus dem Plasmid pCTAP-NS1 mittels PCR amplifiziert (s. Kap. 2.8.1). Gleichzeitig wurden über Primer Restriktionsschnittstellen für das Enzym *Xba I* (s. Tabelle 15, fett) eingefügt. Die optimale Annealingtemperatur wurde mittels Gradienten-PCR (s. Kap. 2.8.1.1.1) bei 57°C ermittelt.

Dieses PCR-Produkt und pEF-FLAG-Xba* wurden mit *Xba I* verdaut, der Vektor dephosphoryliert, Insert und Vektor ligiert (1:10) und transformiert (s. Kap. 2.8.1.1.3 und 2.8.1.1.4.)

Tabelle 15: Primer für die Klonierung von pEF-NS1-FLAG

Name	Sequenz 5' > 3'	T _m [°C]
pFLAG-NS1 Xba FW	TAG TCT AGA ATG GAG CTA TTT AGA GGG	59,3
pFLAG-NS1 Xba RV	TAT TCT AGA CGG CTC ATA ATC TAC AAA G	60,1

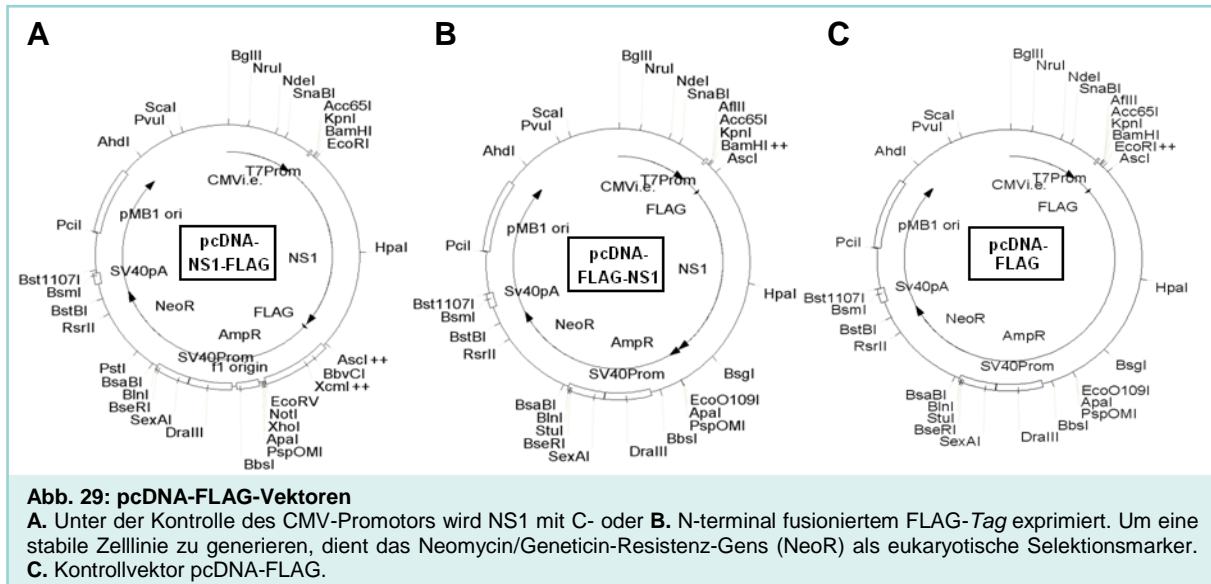
2.8.2 Klonierung des *FLAG*-markierten NS1 in den Expressionsvektor pcDNA3.1

Um eine stabile Expression in eukaryotischen Zellen zu etablieren und in Zellkultur eine ausreichend große Menge an *FLAG*-markiertem NS1-Protein für die nachfolgenden Interaktionsstudien zu gewinnen, wurden die *FLAG*-markierten NS1-Bereiche aus pEF-FLAG-NS1 und pEF-NS1-FLAG in den Expressionsvektor pcDNA3.1 umklont. pcDNA3.1 besitzt im Gegensatz zu den pEF-Plasmiden ein Neomycinresistenzgen, das für die Selektion in Eukaryoten benötigt wird.

Für pcDNA-FLAG-NS1 wurden Start- und Zielvektor (s. Abb. 22A) mit *Xba I* verdaut, für pcDNA-NS1-FLAG wurde *Eco RI* (Fermentas) verwendet (s. 2.8.1.1.3). In Abb. 29A und -B sind die Plasmidkarten der fertigen Vektoren pcDNA-NS1-FLAG und pcDNA-FLAG-NS1 dargestellt.

2.8.2.1 Klonierung des Kontrollvektors pcDNA-FLAG

Als Negativkontrolle wurde das Plasmid pcDNA-FLAG durch die Klonierung des *FLAG-Tags* in pcDNA3.1 mittels *Xba I*-Verdau erzeugt. In Abb. 29C ist die Plasmidkarte des Vektors pcDNA-FLAG dargestellt.



Da die korrekte Sequenz der Plasmid-DNA maßgeblich für den Erfolg des Versuchs verantwortlich war, musste diese durch eine Sequenzierung überprüft werden. Da Sequenzvariationen aufgrund der Bearbeitung der DNA (PCR, verdauen, ligieren) im Bereich des Inserts und den Übergängen in den pcDNA-Vektor wahrscheinlicher auftreten als bei der Plasmidreplikation, wurden diese Regionen sequenziert. Dazu wurden die Primer in Tabelle 16 verwendet. Die Proben wurden von der Firma SeqLab (Hannover) sequenziert.

Tabelle 16: Primer für die Sequenzierung von pcDNA-FLAG-Vektoren mit NS1-Insert

Name	Sequenz 5' > 3'	T _m [°C]
NS-21	AAA AAT GTG GCA AGA AAA ATA CA	56,9
NS-30	CCA ACT AAC AGT TCA CGA AAC	52,6
pcDNA FW	CAC CAA AAT CAA CGG GAC TT	57,4

2.8.3 Maxipräparation

Bakteriensuspensionen (s. Kap. 2.8.1.1.4) von selektionierten Klonen der Plasmide pcDNA-FLAG-NS1, pcDNA-NS1-FLAG und pcDNA-FLAG wurden über Nacht in 250 ml LB-Kanamycin-Medium (30 µg/ml, Sigma; s. Kap. 2.8.1.1.3) expandiert. Es wurde eine Maxipräparation (Macherey & Nagel) nach Herstellerangaben durchgeführt, um eine große Quantität an Plasmid-DNA zu erhalten. Die Nukleinsäurekonzentration wurde wie in Kap. 2.4 beschrieben bestimmt.

2.8.4 Ermittlung der Konzentration des Selektions-Antibiotikums für stabile Transfektionen

Zur Ermittlung der minimalen Konzentration des Selektions-Antibiotikums Geneticin (G418, Biochrom) zur Erstellung einer stabil transfizierten Zelllinie, wurden hMEC-1 Zellen in 6-Well-Kulturplatten (Nunc) ausgesät und nach 24 h mit graduell ansteigenden Konzentrationen von Geneticin (200, 400, 500, 500, 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 $\mu\text{g/ml}$) versetzt. Die Vitalität der Zellen wurde über zwei Wochen hinweg mikroskopisch beobachtet. Es wurde die niedrigste Konzentration ermittelt, bei der das Antibiotikum nach drei Tagen ein deutliches Absterben der Zellen auslöste und nach zwei Wochen alle Zellen abtötete. Diese Reaktion trat bei einer Konzentration von 2000 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin auf. Daher wurde zur Selektion von stabilen Zellen (s. Kap. 2.8.5) eine Konzentration von 2000 $\mu\text{g/ml}$ Geneticin verwendet.

2.8.5 Stabile Transfektion

hMEC-1 Zellen wurden in 6-Well-Kulturplatten jeweils mit dem pcDNA-FLAG-NS1- und pcDNA-NS1-FLAG-Plasmid (jeweils linearisiert durch *Bgl II*-Restriktion (Fermentas)) mittels Nanofectin transfiziert (s. Kap. 2.3.1). Nach 24 h wurde das Standard-hMEC-1-Medium (s. Kap. 2.1.1) durch das Selektionsmedium (s.u.) ersetzt. Das Medium wurde regelmäßig gewechselt, um auch tote Zellen zu entfernen.

Nach etwa 14 Tagen bildeten sich resistente klonale Zellinseln, die das pcDNA-Plasmid stabil in ihr Genom integriert hatten. Diese Zellklone wurden mit der Pipettenspitze gepickt, mit einem Tropfen Selektionsmedium aufgesaugt und in ein Well einer mit Selektionsmedium vorbereiteten 24-Well-Platte (Nunc) transferiert (s. Abb. 30). Sobald sie Kulturen mindestens halbkonfluent waren (nach ca. 2 - 3 Wochen), wurden die Zellklone jeweils in eine kleine Zellkulturflasche (25 cm^2 , Nunc) überführt und expandiert. Daraus resultierten die stabilen Zelllinien hMEC-FLAG-NS1 und hMEC-NS1-FLAG.

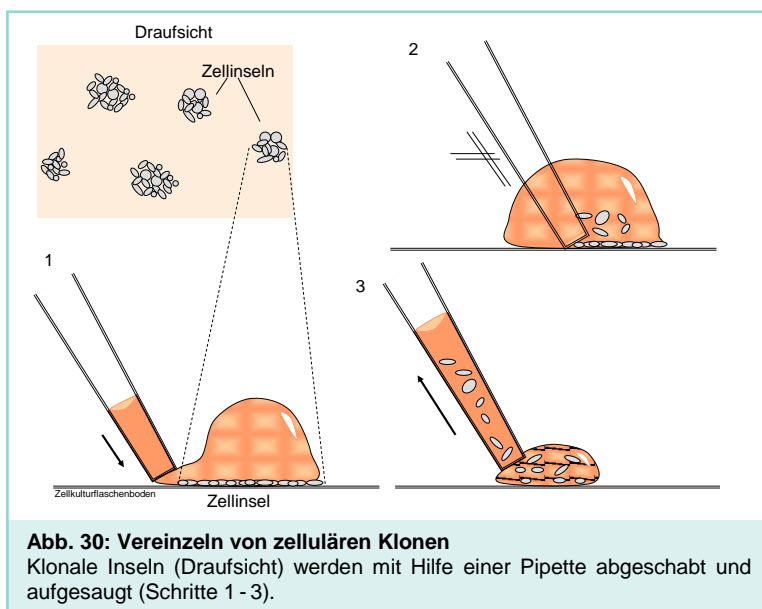


Abb. 30: Vereinzeln von zellulären Klonen
Klonale Inseln (Draufsicht) werden mit Hilfe einer Pipette abgeschabt und aufgesaugt (Schritte 1 - 3).

Selektionsmedium

- 500 ml Medium „SILAC-RPMI w/o L-Lysin, L-Arginin, L-Glutamin“ (PAA)
- 15 % FCS
- 1 % Pen/Strep
- 1 µg/ml Hydrocortison
- 10 ng/ml ECGS
- 300 mg/l L-Glutamin (AppliChem)
- 241,86 mg/l L-Arginin (AppliChem)
- 40 mg/l L-Lysin (AppliChem)
- 2 mg/ml Geneticin

2.8.6 DNA-Analyse der stabilen FLAG-Zelllinien

2.8.6.1 Phenol/Chlorophorm-Extraktion

Um die Integration der pcDNA-Plasmide (NS1-FLAG, FLAG-NS1, s. Kap. 2.8.5) in stabilen Zelllinien nachzuweisen, wurden die hMEC-1-Zellen geerntet und deren DNA mittels Phenol/Chloroform-Aufschluss extrahiert. Klone der zwei stabilen hMEC-Zelllinien wurden jeweils in einer 25 cm² Zellkulturflasche kultiviert und nach Konfluenz entsprechend des Protokolls zur RNA-Extraktion (s. Kap. 2.4) geerntet. Die Zellen wurden durch Zugabe von 250 µl P2-Puffer (Qiagen) und 20 mg/ml Proteinase K (Roth) lysiert und für 30 min bei 55° C schüttelnd inkubiert. Der so entstandene Kernextrakt wurde in 250 µl H₂O verdünnt und nach Zugabe von 500 µl Phenol/Chlorophorm/Isoamylalkohol (25:24:1; Fluka) mit dem Vortex gemischt. Die Probe wurde 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die obere, wässrige Phase wurde in ein frisches Reaktionsgefäß überführt, mit 400 µl Chlorophorm/Isoamylalkohol (24:1; Fluka) versetzt, homogenisiert und 5 min bei 12000 rpm zentrifugiert. Die obere Phase wurde abgenommen und die darin gelöste DNA mit 1 ml Ethanol und 40 µl 3 M NaAc für 1 h bei -70° C gefällt. Zur DNA-Präzipitation wurde die Probe 30 min bei 4° C und 12000 rpm zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 200 µl 70% Ethanol gewaschen, 10 min bei 4° C und 12000 rpm zentrifugiert, für 10 min bei 50° C getrocknet, in 100 µl H₂O gelöst und zur Reinheits- und Konzentrationsbestimmung photometrisch vermessen (s. Kap. 2.4).

2.8.6.2 PCR-Nachweis der integrierten NS1-Konstrukte

Der Test zur Transgenität der zwei FLAG-Zelllinien hMEC-NS1-FLAG und hMEC-FLAG-NS1 (s. Kap. 2.8.5) erfolgte über den PCR-Nachweis der transfizierten DNA (s. Kap. 2.8.2.1). Da das Vorhandensein des vollständigen NS1-Gens für das Interaktions-Experiment essentiell war, wurden hMEC-FLAG-NS1- bzw. hMEC-NS1-FLAG-Zelllinien (s. Kap. 2.8.5) mit zwei verschiedenen Primerpaaren überprüft, die jeweils die halbe und etwa gesamte Länge von NS1 und FLAG umspannen (s. Tabelle 17). Die PCR wurde nach dem Pipettierschema in Kap. 2.8.1.1.1, den PCR-Bedingungen in Tabelle 11 und den Primern in Tabelle 17 unter Verwendung von jeweils 500 ng Template-DNA (s. Kap. 2.8.6.1) vollzogen. Die Elongationszeiten der PCR-Zyklen wurden gemäß der Amplifikationsgeschwindigkeit der *Velocity* DNA Polymerase (Bioline) von 15 s/1000 bp der zu erwartenden Produktlänge (s. Tabelle 17) angepasst.

Tabelle 17: Primer zum Nachweis der FLAG-Plasmide in stabilen hMEC-1-Zellen

Zelllinie	Primer	Sequenz 5' > 3'	T _m [°C]	Produkt
hMEC-FLAG	pcDNA FW	CAC CAA AAT CAA CGG GAC TT	57,4	330 bp
	FLAG antisense	CTT GTC ATC GTC GTC CTT GTA GTC	60,6	
hMEC-FLAG-NS1	FLAG sense	GAC TAC AAG GAC GAC GAT GAC AAG	60,6	1050 bp
	NS-18	TTC CTG TAC TTG GCG GCC	59,1	1963 bp
	FLAG sense	s.o.	s.o.	
	NS-36	GGC AGC TAC ACC GCA CCA A	62,6	
hMEC-NS1-FLAG	NS-5	CTG ACT GGG AAC CAC TAA CT	51,3	1657 bp
	NS-32	TAA CAG TTC ACG AAA CTG GTC	52,7	2468 bp
	pcDNA FW	CAC CAA AAT CAA CGG GAC TT	57,4	
	FLAG antisense	s.o.	s.o.	

2.8.7 PCR-Nachweis der transfizierten FLAG-Kontrollzellen

pcDNA-FLAG wurde als Kontrolle zu den hMEC-FLAG-NS1- bzw. hMEC-NS1-FLAG-Zelllinien (s. Kap. 2.8.5) verwendet, transient in hMEC-1 Zellen transfiziert und 48 h p.t. geerntet. Als Nachweis für die Aufnahme der pcDNA-FLAG-DNA (s. Kap. 2.8.2.1) durch die hMEC-1-Zellen wurde die DNA dieser Zellen wie in Kap. 2.8.6.1 beschrieben extrahiert und mittels PCR detektiert (Pipettierschema Kap. 2.8.1.1.1, PCR-Bedingungen Tabelle 11, Primern Tabelle 17).

2.8.8 Expressionsnachweis von NS1-FLAG/FLAG-NS1 auf RNA-Ebene

Nachdem die Integration der pcDNA-Plasmide (NS1-FLAG bzw. FLAG-NS1, s. Kap. 2.8.2.1) in die jeweilige Zelllinie (s. Kap. 2.8.5) nachgewiesen worden war, wurde die Expression der betreffenden fusionierten Gene FLAG-NS1 bzw. NS1-FLAG auf RNA-Ebene untersucht. Hierfür wurde die gesamte RNA aus einem konfluenten Zellrasen einer 25 m² Zellkulturflasche wie in Kap. 2.4 beschrieben isoliert und davon 1,3 µg in cDNA revers transkribiert. Der Nachweis der Expression erfolgte über RT-PCRs, bei denen jeweils 1 µl cDNA eingesetzt wurde (s. Kap. 2.8.6.2). Für das FLAG-NS1-Produkt wurden dieselben Primerpaare wie in Tabelle 17 verwendet. Für NS1-FLAG wurde anstelle des Primerpaars „pcDNA FW - FLAG antisense“ aus Tabelle 17 das Primerpaar „NS-33 - FLAG antisense“ (Produktlänge: 375 bp) verwendet (NS-33 s. Tabelle 18).

2.8.9 Immunpräzipitation der FLAG-NS1-Fusionsproteine

Zum Expressionsnachweis der FLAG-NS1-Gene auf Proteinebene (s. Kap. 2.8.10) wurde die Gesamtproteinmenge nach Herstellerangaben aus je 5×10^6 Zellen der stabilen Zelllinien hMEC-FLAG-NS1 und hMEC-NS1-FLAG (s. Kap. 2.8.5) isoliert und mit 40 µl der α FLAG-Agarose-Suspension des EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gels (Sigma) aufgereinigt. Die Bindung der markierten Proteine an die Agarose-beads erfolgte über Nacht. Die Proteine wurden durch Zugabe von 20 µl *Sample Buffer* (s.u.) und Aufkochen wieder eluiert.

Sample Buffer (2×)

- 125 mM Tris, pH6,8 mit HCl
- 4% SDS
- 20% Glycerol
- 0,004% Bromphenolblau

2.8.10 Expressionsnachweis der NS1-FLAG-Gene auf Proteinebene

Nach Untersuchung der NS1-FLAG-Genexpression auf RNA-Ebene (s. Kap. 2.8.8) wurde darüber hinaus die Proteinexpression von FLAG-NS1 bzw. NS1-FLAG in Western Blot Analysen nachgewiesen. Hierfür wurde das gesamte Eluat der Immunpräzipitation (s. Kap. 2.8.9) sowie reine Zelllysate (s. Kap. 2.7.1) der beiden stabilen Zelllinien hMEC-FLAG-NS1 und hMEC-NS1-FLAG (s. Kap. 2.8.5) auf einem 12 %igen SDS-Polyacrylamidgel elektrophoretisch getrennt (s. Kap. 2.7.3). Die NS1-Proteine wurden anschließend in Western Blot Analysen indirekt über Hybridisierung mit dem FLAG-M2-Antikörper nachgewiesen (s. Kap. 2.7.5).

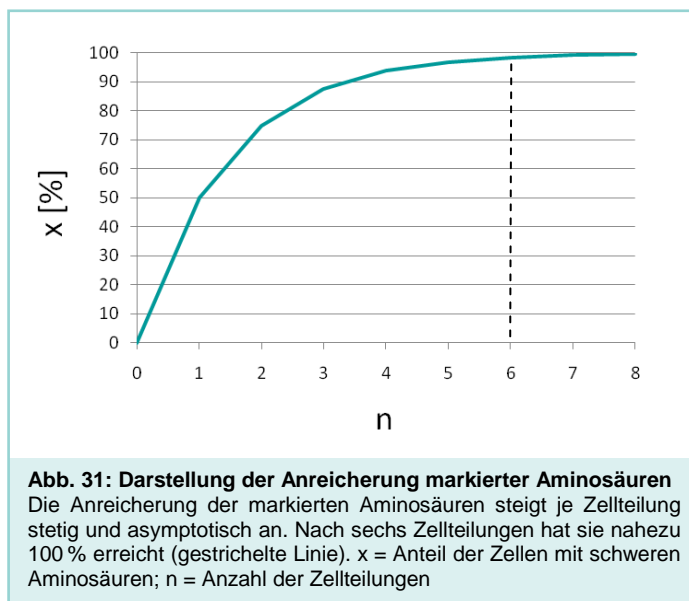
2.8.11 SILAC (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*) und Immunpräzipitation

Das SILAC-Experiment wurde mit den stabilen Zelllinien hMEC-FLAG-NS1 und hMEC-NS1-FLAG durchgeführt. Im Vorfeld wurde die Verdopplungszeit der Zellen bestimmt, um die Zeitdauer berechnen zu können, die die Zellen benötigen um sich fast vollständig mit zugesetzten „schweren“ Aminosäuren (^{13}C -Arginin und ^{13}C -Lysin) anzureichern. Dazu wurden 6×10^5 hMEC-1-Zellen gleichmäßig in die Felder einer 6-Well-Platte verteilt. Die Zellen der Felder wurden im Abstand von 24 h geerntet und ausgezählt (s. Kap. 2.1.1).

Die ermittelte Verdopplungszeit betrug 24 h. Hieraus lässt sich die Anreicherung mit „schweren“ Aminosäuren folgendermaßen berechnen:

$$x = (100 - \frac{1}{2^n} \times 100)\%$$

Je Zellteilung (n) veränderte sich der Anteil (x) der Zellen mit „schweren“ Aminosäuren (s. Abb. 31). Nach sechs Tagen der Zellkultivierung in Medium mit den „schweren“ Aminosäuren ^{13}C -Arginin bzw. ^{13}C -Lysin ist eine nahezu vollständige, und damit ausreichende Markierung (ca. 98,4%) aller Proteine erreicht.



Daher wurden hMEC-1 Zellen, die FLAG-NS1 und NS1-FLAG stabil exprimierten, insgesamt sechs Tage in SILAC-Medium (s.u.) mit zugesetzten ^{13}C -Aminosäuren (Eurisotop) kultiviert. Als Kontrolle wurden 48 h vor Ablauf der sechs Tage 10^7 Zellen hMEC-1 ausgesät, mit dem Plasmid pcDNA-FLAG transfiziert (s. Kap. 2.3.1 und 2.8.2.1) und in Selektionsmedium (s. Kap. 2.8.5) mit natürlichen ^{12}C -Aminosäuren kultiviert. Nach 48 h wurden die Kontrollzellen sowie die beiden stabilen Zelllinien (s. Kap. 2.8.5) geerntet. Jeweils 5×10^6 Zellen der stabilen FLAG-NS1/NS1-FLAG-Zelllinien wurden mit der gleichen Menge der Kontrollzellen gemischt und anschließend über das EZview Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel unter

Verwendung von 40 µl αFLAG-Agarose-Suspension aufgereinigt (s. Kap. 2.8.9). Die Mischung der Proben vor der Aufreinigung gewährleistete die absolut gleiche Behandlung beider Proben und damit die Minimierung unspezifischer Fehler durch verschiedene Handhabung der Proben. Dies gilt bezüglich der Bindung an die Matrix sowie der weiteren Verarbeitung wie dem tryptischen Verdau der Proteine auf den Agarose-beads oder der anschließenden Reinigung der Peptidextrakte.

Die Agarose-beads mit den gebundenen Proteinen wurde vor der Elution auf Trockeneis zu Frau Dr. Elke Hammer (Universitätsmedizin Greifswald) zur weiteren Bearbeitung gesandt. Alle weiteren Verarbeitungsschritte und Analysen wurden in Kooperation mit Frau Dr. Elke Hammer, die die Experimente durchführte, vollzogen und sind im Folgenden beschrieben.

SILAC-Medium

Wie Selektionsmedium (s. Kap. 2.8.5), folgende Zutaten wurden substituiert:

- FCS durch dialysiertes FCS (PAA)
- L-Arginin durch L-Arginine:HCl, (U-13C6, 98 %) (Eurisotop)
- L-Lysin durch L-Lysine:2HCl, (U-13C6, 98 %) (Eurisotop)

2.8.12 Präparation von Peptidextrakten für quantitative Proteomanalysen

Kooperation und Durchführung mit Frau Dr. Elke Hammer. Die Agarose-beads mit gebundenen Proteinen (s. Kap. 2.8.11) wurden drei Mal mit 100 µl 20 mM NH₄HCO₃ gewaschen, um hohe Salzkonzentrationen zu entfernen und den pH auf milde alkalische Konditionen für eine optimale proteolytische Spaltung der Proteine einzustellen. 40 µl (400 ng) von modifiziertem Trypsin (Promega) wurden hinzugefügt und für 3 h bei 37° C inkubiert. Der Überstand wurde abgenommen und das Trypsin durch Zugabe von Essigsäure (Endkonz. 1 %) inaktiviert. Die Peptidmischung wurde über C-18 Reverse-Phase-Material (ZipTip µ-C18, Millipore) entsalzt und mit 50 % und 80 % Acetonitril (ACN) in je 1 % Essigsäure, eluiert. Die gepoolten Eluate wurden in einer Vakuumzentrifuge auf 2 µl aufkonzentriert (5303, Eppendorf) und in 2 % ACN in 0,1 % Essigsäure resuspendiert.

2.8.13 Massenspektrometrie

Kooperation und Durchführung mit Frau Dr. Elke Hammer. Die Peptide (s. Kap. 2.8.12) wurde in einem nicht-linearen 86-min-Gradienten von 5 - 40 % ACN in 0,1 % Essigsäure bei einer konstanten Durchflussrate von 300 nl/min auf einer Reverse-Phase-Säule (PepMap C18, 75 µl id × 15 cm, LC Packings) mit einer nonp-HPLC Easy-nLC (Proxeon, Thermo Scientific) aufgetrennt. Das Eluat wurde direkt in das LTQ-Orbitrap XL Massenspektrometer

2 Material und Methoden

(Thermo Electron), ausgestattet mit einer Nano-Elektronenspray-Ionenquelle, weitergeleitet. Bei der Messung in einem LTQ-Orbitrap-Massenspektrometer wurden fünf MS/MS-Spektren je hochauflösendem MS-Übersichtsscan in einem Daten-abhängigen Modus mit einer Ausschlusszeit von 60 s aufgezeichnet.

2.8.13.1 Datenbank-Suche

Kooperation und Durchführung mit Frau Dr. Elke Hammer. Die Proteine, die in der massenspektrometrischen Untersuchung (s. Kap. 2.8.13) detektiert wurden, wurden mittels automatischer „Sequest“ (rel. 2.7)-Suche mit der *Proteom discoverer software* 1.3 (Thermo Scientific) in einer SwissProt-Datenbank (Rel. 2012_01, begrenzt auf humane Einträge, erweitert um die Aminosäuresequenz des B19V-NS1-Proteins) identifiziert. Die Massentoleranz (MS) wurde auf 10 ppm und die Fragmentmassen-Toleranz auf 1 Da festgelegt. Sowohl Methionin-Oxidierung als auch SILAC-markiertes ^{13}C (6) in Lysin und Arginin wurden als variable Modifikationen betrachtet. Als signifikant wurden Proteine angesehen, die anhand von Peptiden mit einem mittleren oder hohen Konfidenzwert, entsprechend $q < 0,05$, durch das „*Percolator tool*“ im *Proteom Discoverer* 1.3 identifiziert wurden.

2.8.13.2 Quantitative Analyse

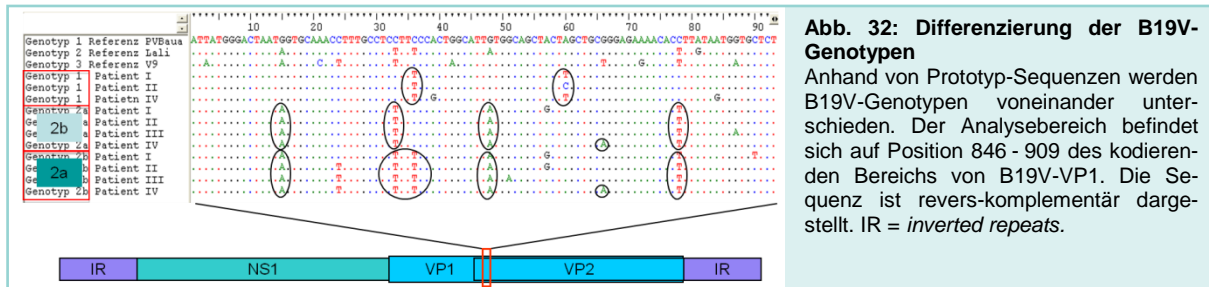
Kooperation und Durchführung mit Frau Dr. Elke Hammer. Die Quantifizierung der detektierten Proteine (s. Kap. 2.8.13) wurde unter Verwendung des *Proteom Discoverers* 1.3 durchgeführt. Die Peptid-Ratios (*heavy/light*) wurden jeweils für Arginin- und/oder Lysin-enthaltende Peptide berechnet, indem ein Quotient der Peakflächen der markierten (*heavy*) Peptide und der Peakfläche der nichtmarkierten (*light*) Peptide gebildet wurde. Die Peptid-Ratios für alle sequenzierten Arginin- und Lysin-enthaltende Peptide wurden gemittelt und mit dem Median aller Ratios normalisiert. Der Versuch wurde einmal wiederholt. Die Proteine wurden als angereichert angesehen, sobald die *heavy/light*-Ratios in beiden Replikaten über dem Wert 1,5 lagen und die Quantifizierung auf mehr als zwei Spektren beruhte.

2.9 Genotypisierung patientenspezifischer Parvovirus B19 Genom-Isolate

2.9.1 Auswahl der Proben

Die Arbeit mit patientenspezifischem Material erfolgte nach Zustimmung der Ethikkommission für das Teilprojekts B5, SFB Transregio 19 „Parvovirus B19-assoziierte Inflammatorische Kardiomyopathie: Molekulare Mechanismen der endothelialen und diastolischen Dysfunktion“ unter der Projektnummer 157/2008BO2.

Aus der Probensammlung des Diagnostiklabors der Molekularen Pathologie Tübingen wurden Proben nach Vorkommen der B19V-Genotypen-1 und -2 analysiert. Es handelte sich hierbei um DNA-Isolate aus Herzbiopsien, die mittels entsprechender *nested*-PCR (nPCR)-Diagnostik B19V-positiv getestet wurden. Zum Zweck der Qualitätskontrolle wurden diese nPCR-Produkte der Routinediagnostik sequenziert und mit B19V-Genotypen-1 und -2 Referenzsequenzen (PCB-Aua [Genotyp 1] und LaLi [Genotyp 2]; NCBI Genbank Nr. M13187, AY044266) abgeglichen. Die Differenzierung in die unterschiedlichen B19V-Genotypen erfolgte anhand eines DNA-Abschnitts im VP1-Bereich des B19V-Genoms (s. Abb. 32, Position 846 - 909 des kodierenden Bereichs des VP1-Gens; Bültmann et al. 2003). In dieser Region wurde ebenfalls zwischen den B19V-Varianten 2a (T-T) und 2b (T) unterschieden.



2.9.2 PCR-Amplifikation verschiedener Genom-Bereiche von Parvovirus B19

Da die patientenspezifischen B19V-Isolate nur geringe Mengen des viralen Genoms enthielten, wurde die DNA der in den folgenden Kapiteln 2.9.2.1 - 2.9.2.3 beschriebenen Bereiche des B19V-Genoms in nPCRs amplifiziert.

Die in den Kapiteln 2.9.2.1 - 2.9.2.3 beschriebenen B19V-spezifische PCRs wurden nach dem Pipettierschema in Kap. 2.8.1.1.1, den PCR-Bedingungen in Tabelle 11 und den Primern in Tabelle 18 unter Verwendung von jeweils 400 ng Template-DNA durchgeführt. Die Annealingtemperatur der Primerpaare wurde jeweils mit NetPrimer (PREMIER Biosoft 2012) bestimmt.

2 Material und Methoden

In jeder PCR-Reaktion wurde eine Negativkontrolle ohne Template mitgeführt, um eine Kontamination durch Fremd-DNA auszuschließen. 5 µl des PCR-Produkts wurden auf einem 2%igen Agarosegel (Elektrophorese bei 120 V, 35 min) überprüft. Alle PCR-Produkte wurden anschließend mit Hilfe des NucleoSpin II Gel Extraction Kits nach Herstellerangaben aufgereinigt (*Protocol for PCR clean-up*) und mit 30 µl dH₂O eluiert.

2.9.2.1 Amplifikation der NTP-Bindestelle aus B19V-NS1

Insgesamt 51 patientenspezifische DNA-Isolate (Genotyp 1: 17, Genotyp 2: 34) aus der Probensammlung des Diagnostiklabors der Molekularen Pathologie Tübingen wurden im Bereich der NTP-Bindestelle von B19V-NS1 (s. Kap. 1.5.1.1) mittels semi-nPCR amplifiziert. Bei der semi-nPCR wird in der zweiten PCR nur ein Primer ausgetauscht, der mit einem der beiden Primer aus der ersten PCR ein Paar bildet (s. Tabelle 18). Das DNA-Motiv der NTP-Bindestelle ist auf Position 1415 nt - 1687 nt (bezogen auf GenBank M13178) lokalisiert. Für Genotyp 1 wurden die Primer NS1-NTP 4-6 verwendet, für Genotyp 2 NS1-NTP 1-3.

2.9.2.2 Amplifikation des kodierenden Bereichs von Parvovirus B19

Für die Sequenzierung des kodierenden Bereichs NS1/VP1/VP2 (Position 436 nt - 4789 nt bezogen auf M13178) wurden drei Proben aus der Probensammlung des Diagnostiklabors der Molekularen Pathologie Tübingen des Genotyps 1 und vier Proben des Genotyps 2 ausgewählt. Unter Verwendung von 21 nPCR-Primerpaaren (s. Tabelle 18) wurden 21 überlappende DNA-Teile amplifiziert.

Tabelle 18: Primer für die Sequenzierung von B19V-Genomen

Primer NS-1 und NS-2 bilden ein PCR-Paar, Primer NS-3 und NS-4 sind das dazugehörige Paar für die nPCR-Reaktion usw.. Die Primer umspannen den kodierenden Bereich des B19V-Genoms von Position 436 nt in B19V-NS1 bis Position 4789 nt in B19V-VP1/2. Die Positionsangaben beziehen sich auf Genbank M13178.

Primer	Richtung	Sequenz 5' > 3'	Postion	Primer	Richtung	Sequenz 5' > 3'	Postion
NS-1	forward	tgt gag cta act aac agg tat t	396-417	VP-1	forward	tta cct gtc tgg att gca aag	2419-2439
NS-2	reverse	agc tta gaa gcc aca ctg ct	587-606	VP-2	reverse	acg agc aac taa gtc aaa cag	2625-2645
NS-3	forward	cta aca ggt att tat act act tg	400-422	VP-3	forward	ctg tct gga ttg caa agc ttt	2423-2443
NS-4	reverse	cca cac tgc tta agt ata ttg	576-596	VP-4	reverse	aac taa gtc aaa cag aga gga t	2618-2639
NS-5	forward	ctg act ggg aac cac taa ct	530-549	VP5	forward	att tct tta gat aat ccc cta ga	2582-2604
NS-6	reverse	cag tta caa ggt gat aaa gta c	751-775	VP-6	reverse	cag ctt gta gct cat tgc ca	2849-2868
NS-7	forward	gga acc act aac tca tac taa	544-564	VP-7	forward	tag ata atc ccc tag aaa acc	2589-2609
NS-8	reverse	aca agg tga taa agt aca tta tta	747-770	VP-8	reverse	ttg tag ctc att gcc agg c	2841-2865
NS-9	forward	aac ctc aca gtg tgt gta ga	718-737	VP-9	forward	gca agt tag cgt aca act acc	2807-2827
NS-10	reverse	act act agt gtc att tat ggc t	984-1005	VP-10	reverse	ggg gca gct gca cct ttt aa	3045-3064
NS-11	forward	tca cag tgt gtg tag agg g	722-740	VP-11	forward	aag tta gcg tac aac tac ccg	2809-2829
NS-12	reverse	gtc att tat ggc tgt ggt aat	990-1003	VP-12	reverse	gca gct gca cct ttt taa agt a	3041-3062
NS-13	forward	ttc tgc tac ttt tag aag ggg	930-950	VP-13	forward	ttc aag cac aag tag taa aag ac	3013-3935
NS-14	reverse	act tcc act gtg cct act gc	1179-1198	VP-14	reverse	gag aaa aca cct tat aat ggt g	3285-3306
NS-15	forward	ttt aga agg gga gct tgc ca	940-959	VP-15	forward	aag cac aag tag taa aag act ac	3016-3038
NS-16	reverse	cca ctg tga cta ctg ctt ag	1168-1187	VP-16	reverse	aaa cac ctt ata atg gtg ctc t	3281-3302
NS-17	forward	gaa act agt tga ctt taa cca g	1144-1165	VP-17	forward	ttc cag aca gtt ttt aat tcc tt	3244-3266
NS-18	reverse	ttc ctg tac ttg gcg gcc	1425-1442	VP-18	reverse	ctc cag ttt tgt ctg taa cat c	3519-3540
NS-19	forward	tag ttg act tta acc agt aca c	1149-1170	VP-19	forward	cag aca gtt ttt aat tcc tta tg	3247-3269
NS-20	reverse	tgt act tgg cgg ccc ata aa	1412-1431	VP-20	reverse	cag ttt tgt ctg taa cat cct ta	3515-3537
NS-21	forward	aaa aat gtg gca aga aaa ata ca	1382-1404	VP-21	forward	act gta acc ata tca gaa att gc	3489-3511
NS-22	reverse	tgc tgg tta taa cca cag gta	1658-1678	VP-22	reverse	tcc aga gat tcc ttg tgt gtt	3708-3728
NS-23	forward	tgt ggc aag aaa aat aca ctg t	1387-1407	VP-23	forward	taa cca tat cag aaa ttg ctg tta	3493-3516
NS-24	reverse	tgg tta taa cca cag gta ctc	1655-1675	VP-24	reverse	aga gat tcc ttg tgt gtt aac a	3697-3718
NS-25	forward	aaa tgc gtg gaa gtg tag ct	1635-1654	VP-25	forward	cct caa tat gct tac tta aca gt	3675-3698
NS-26	reverse	gga ggg cat ctg cat taa ttc	1905-1925	VP-26	reverse	tgt aga cac tga gtt tac tag t	4000-4021
NS-27	forward	atg cgt gga agt gta gct gt	1637-1656	VP-27	forward	caa tat gct tac tta aca gta gg	3671-3693
NS-28	reverse	ggc atg tgc att aat tcc agg	1895-1914	VP-28	reverse	gac act gag ttt act agt	4000-4017
NS-29	forward	aac tgg gca ata aac tac act t	1871-1892	VP-29	forward	acc atg caa ttc agc ccc aa	3970-3989
NS-30	reverse	cca act aac agt tca cga aac	2179-2199	VP-30	reverse	ttc att tgg aaa tct acc cac t	4234-4255
NS-31	forward	ggc aat aaa cta cac ttt tga tt	1876-1898	VP-31	forward	atg caa ttc agc ccc aaa act	3973-3993
NS-32	reverse	taa cag ttc acg aaa ctg gtc	2161-2187	VP-32	reverse	ttt gga aat cta ccc act cct	4231-4251
NS-33	forward	atc gtg gga aga agc ctt ct	2140-2159	VP-33	forward	ggt aac gct gaa gac aaa gag	4209-4229
NS-34	reverse	cca cat gcg agc tac acc	2358-2375	VP-34	reverse	aat att tga gga ggt ggc tga	4481-4501
NS-35	forward	gga aga agc ctt cta cac ac	2146-2165	VP-35	forward	aac gct gaa gac aaa gag tat c	4212-4233
NS-36	reverse	ggc agc tac acc gca cca a	2344-2362	VP-36	reverse	ttg agg agg tgg ctg atg caa	4476-4496
NS-37	forward	tat aat gga tgg aaa ttt cga ga	2315-2337	VP-37	forward	cag ttt gca gcc tta gga gg	4449-4468
NS-38	reverse	att cca caa att gct gat aca c	2505-2526	VP-38	reverse	tgg taa atg acc tgc tgc gt	4669-4688
NS-39	forward	gaa att tgc aga att tac ccc a	2325-2347	VP-39	forward	ttt gca gcc tta gga gga tg	4452-4471
NS-40	reverse	aat tgc tga tac aca gct tta g	2497-2518	VP-40	reverse	taa atg acc tgc tgc gtg c	4667-4685
NS1 NTP	forward	gca ttc aga ctt tga gca ggt	1266-1286	VP-41	forward	cag ttt gca gcc tta gga gg	4632-4649
NS1 NTP 2	reverse	gct tta cca ttc gct cct tt	1740-1759	VP-42	reverse	agg tac agt ctg ggt ggt ac	4839-4858
NS1 NTP 3	reverse	agg ctt tag cat gga cag ttg	1718-1738	VP-43	forward	ttt gca gcc tta gga gga tg	4452-4471
NS1 NTP 4	forward	ggg gca gca tgt gtt aaa gt	1353-1372	VP-44	reverse	tac agt ctg ggt ggt act gg	4843-4862
NS1 NTP 5	reverse	tcc cag ctt tgt gca tta ca	1834-1853				
NS1 NTP 6	reverse	cat gtc agg gct gca tct ta	1772-1791				

2.9.2.3 Amplifikation des Bereichs NS1/VP1u aus Parvovirus B19

Für die Sequenzierung der NS1/VP1u-Region (s. Kap. 1.2.2) wurden von jedem B19V-Genotyp ca. 20 Proben aus der Probensammlung des Diagnostiklabors der Molekularen Pathologie Tübingen randomisiert ausgewählt. Der NS1/VP1u-Abschnitt der B19V-DNA

2 Material und Methoden

wurde mittels semi-nPCR vervielfältigt. Diese erfolgte in zwei PCR-Reaktionen, wobei das Produkt der ersten PCR (Primer NS-37 und VP-2, s. Tabelle 18) als Template für die zweite PCR fungierte. In der zweiten PCR-Reaktion wurde ein weiterer *forward*-Primer verwendet, der 11 nt *downstream* des ersten lag (NS-39, s. Tabelle 18). Die Primer umschließen einen 320bp langen Abschnitt des Übergangsbereichs vom NS1- in das VP1-Gen.

2.9.3 Sequenzierungs-PCR nach Sanger

Die Sequenzierung der PCR-Produkte aus den Kapiteln 2.9.2.1 - 2.9.2.3 erfolgte mittels Kettenabbruchverfahren. Jedes PCR-Fragment wurde bidirektional sequenziert, um eine maximale Sequenzgenauigkeit zu erhalten. Dazu wurde die Sequenzierungs-PCR jedes DNA-Fragments sowohl mit dem *forward*- als auch mit dem *reverse*-Primer der zweiten nPCR bzw. semi-nPCR durchgeführt (s. Tabelle 18). Alle nötigen Sequenzierungs-PCR-Chemikalien wurden von Applied Biosystems bezogen. Die PCRs wurden nach dem unten aufgeführten Pipettierschema, den Primern in Tabelle 18 und den PCR-Bedingungen in Tabelle 19 durchgeführt.

- 5,0 µl aufgereinigtes PCR-Produkt
- 1,0 µl Primer (10 pmol/µl, NS39 bzw. VP2)
- 1,0 µl 5x-Puffer
- 1,0 µl H₂O
- 2,0 µl Big Dye Ready Reaction Mix

Tabelle 19: Bedingungen für die Sequenzierungs-PCR

	Temperatur [°C]	Zeit [min]
initial	95	1:00
25 x	95	0:15
	53	0:15
	60	1:15
	4	∞

2.9.3.1 Fällung und Sequenzierung der Produkte der Sequenzierungs-PCR

Das Produkt der Sequenzierungs-PCR (s. Kap. 2.9.3) wurde in 300 µl 100 %igem Ethanol (Merck), 90 µl dH₂O und 11 µl Natriumacetat (3 M, pH 5,0; Merck) gefällt und bei 10000 rpm und 4° C für 40 min zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde mit 300 µl 70 %igem Ethanol gewaschen und bei 4° C für 10 min bei 10000 rpm zentrifugiert und im Heizblock ca. 10 min bei 50° C getrocknet.

Das getrocknete DNA-Pellet wurde in 20 µl *HiDi*-Formamid (Applied Biosystems) resuspendiert, in ein 0,5 ml Röhrchen überführt, dieses mit Septen verschlossen und im *310 Genetic Analyzer* sequenziert. Der Sequenzierer wurde nach Angaben des Handbuchs konfiguriert. Es wurde eine lange Kapillare (62 cm) zusammen mit dem passenden Polymer (POP-6, Applied Biosystems) verwendet.

2.9.4 Sequenzanalysen

Das Programm BioEdit v7.0.1 (*Dept of Microbiology, North Carolina State University; <http://www.mbio.ncsu.edu/BioEdit/bioedit>*) wurde für die Auswertung der Daten der Sequenzierung und die Visualisierung der Elektropherogramme verwendet. Alignments von DNA- und Proteinsequenzen wurden mit dem ClustalW-Verfahren (Thompson et al. 1994) erstellt. Genetische Distanzen wurden mit der zwei-Parameter-Methode nach Kimura (Kimura 1980) berechnet und phylogenetische Bäume mit der *neighbour-joining*-Methode (Saitou & Nei 1987) erzeugt. Beide Vorgänge wurden bei der Erstellung eines Alignments mit BioEdit automatisch durchgeführt. Mit TreeView v1.6.6 (*<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview>*) wurden diese Daten visualisiert. Entropie-Plots zur Darstellung von Mutationshäufigkeiten in Zusammenhang mit der Nukleotidposition einer Sequenz wie auch die Sequenzidentitätsmatrix zur Bestimmung der prozentualen Sequenzvariabilität wurden ebenfalls mit BioEdit generiert.

2.10 Geräte und Technik

Pipetten:	Rainin, Gilson
Pipettierhilfe:	Accu-Jet, Accu-JetPro, Neolab
Sterilwerkbank:	LaminAir HB2448, Hereaus
Ultrazentrifuge:	Sorvall Combi Plus
Minizentrifuge:	Biozym
Kühlzentrifuge	Hereaus Multifuge 1S-R, Thermo
Zentrifugen Kühlraum	Sorvall MC 12V
Kleine Zentrifuge Labor	Eppendorf Centrifuge 5417C
Zentrifuge Viruslab. groß:	Hermle Z383 K
Zentrifuge Zellkultur:	Hereaus Multifuge 1S Thermo
Vortex:	VF2, Janke & Kunckel
Brutschrank:	Typ 6000, Hereaus
Thermomixer:	Eppendorf
Magnetrührer	Heidolph
Rolleninkubator:	Neolab
Waage:	Sartorius Basic, Sartorius
PCR-Thermocycler:	Primus 25 advanced (Peqlab)
Kapillar-Sequenzierer:	ABI PRISM 310 Genetic Analyzer, Applied Biosystems
Gradienten-Thermocycler:	Tgradient Thermocycler, Biometra
Geldokumentationssoftware:	DeVision G 2.0, Decon Science Tec GmbH
Elektrophoresekammer	
Agarosegele:	Owl, Peqlab
Mikrowellenherd	Sharp
Mikroskop Zellkultur:	IMT-2 Phasenkontrast KLWCD 0.30, Olympus
Fluoreszenzmikroskop:	EVOSfl, Peqlab
Neubauer-Zählkammer:	Brand
Spektrometer (Protein):	SmartSpec3000 (BioRad)
Spektrometer (Nukleinsäuren):	NanoDrop
pH-Meter:	pH 525 WTW
UV-Crosslinker:	Stratalinker 1800, Stratagene
Elektrophoresekammer	
SDS-PAGE:	TetraCell MiniProtean System, BioRad
Semi-Dry Blotkammer:	Trans-Blot SD Semi-dry transfer cell, BioRad
Spannungstransformator:	BioRad
Entwicklermaschine:	Agfa

3 Ergebnisse

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden molekulare Pathogenitäts-Determinanten des humanen Parvovirus B19 untersucht, die zu einer inflammatorischen Kardiomyopathie beitragen können. Hierbei wurde der Einfluss des Nicht-Struktur-Proteins NS1 des humanen Parvovirus B19 auf die zelluläre Signaltransduktion, insbesondere auf den MAPK/ERK- und eNOS-Weg analysiert. Es wurde überprüft, wie die Infektion mit B19V die molekularen Mechanismen der inflammatorischen Signaltransduktion beeinflussen und damit zur Pathogenese von B19V beitragen kann. Dafür wurden transiente Transfektionen von humanen ECs (hMEC-1) mit den rekombinanten Plasmiden pcDNA-NS1 und pcDNA-NS1-K334E sowie B19V-Infektionen der B19V-permissiven Megakaryozytenzelllinie UT-7/EPO und der Untersuchungen an einer konditionalen, stabilen B19V-NS1-exprimierenden EC-Linie durchgeführt. Über eine Zeitkinetik von fünf Tagen wurden Schlüsselproteine des MAPK-Signalwegs auf ihre Aktivierung und Expressionsregulation unter Einwirkung von B19V bzw. des NS1-Proteins und einer funktionsveränderten NS1-Mutante funktionell analysiert. Durch die Induktion von B19V-NS1 in einer stabilen hMEC-NS1-Zelllinie wurde der Einfluss des parvoviralen Proteins NS1 auf die Expression verschiedener Zielgene des MAPK- und eNOS-Signalwegs untersucht.

Um den Einfluss von genetischen Varianten auf die Pathogenität des Virus zu untersuchen, wurden in weiteren Experimenten B19V-Mutanten aus patientenspezifischen DNA-Isolaten identifiziert und charakterisiert. Neben der phylogenetische Differenzierung der B19V-Genotypen 1 und 2 und wurden Analysen von Genotyp 2-Varianten durchgeführt, um die potentielle Unterteilung in neue Subtypen zu untersuchen.

3.1 Einfluss von Parvovirus B19 auf die MAPK-Signaltransduktion

Die Infektion myokardialer Endothelzellen (EC) mit Parvovirus B19 (B19V) kann mit einer inflammatorischen Kardiomyopathie (iCMP) sowie einer endotelialen Dysfunktion (ED) einhergehen (Kandolf 2004). Molekulare Mechanismen, die zur Entstehung einer B19V-iCMP führen können, sind bislang wenig verstanden. Die MAPK-Signaltransduktion spielt bei der Regulation der Immunantwort, Entzündungsreaktionen und proapoptischen Prozessen eine wichtige Rolle. Ziel der vorliegenden Untersuchungen war es, den Einfluss von B19V und B19V-Proteinen, insbesondere des B19V Nichtstruktur-Proteins NS1, auf die p38-MAPK- und p44/42-ERK-Regulation in funktionellen Experimenten zu analysieren.

Zunächst wurde in Zellkulturexperimenten die Interaktion von B19V-NS1 mit der MAPK-Signaltransduktion analysiert. 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, 72 h und 96 h (im Folgenden: 12 - 96 h) nach Transfektion des B19V-NS1-Gens in humane semi-permissive ECs (hMEC-1) wurde

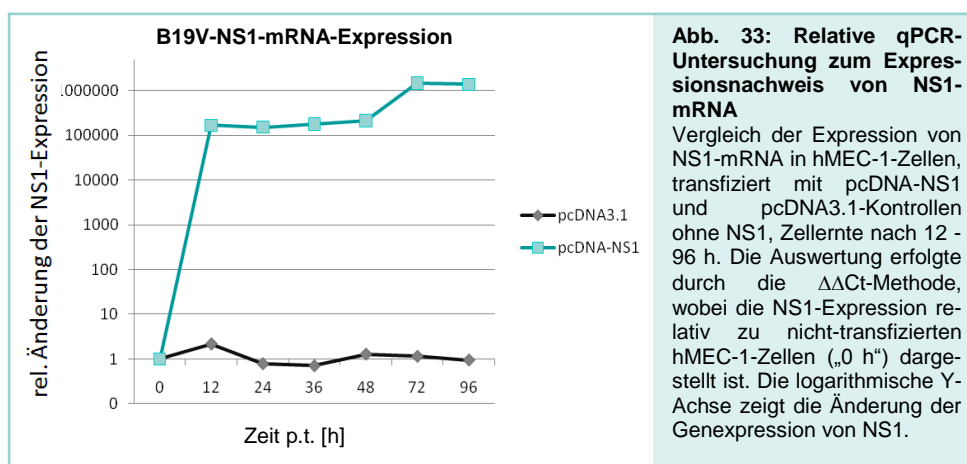
3 Ergebnisse

die Expression des B19V-NS1-Gens auf RNA-Ebene nachgewiesen und Veränderungen der MAPK-Signalweg-Proteine untersucht.

In parallelen Experimenten wurde die Infektion von B19V-permissiven Megakaryozyten (UT-7/EPO) mit B19V durchgeführt und die Expression von B19V-NS1 und B19V-VP2 überprüft. Anschließend wurde die Aktivierung der Schlüsselproteine p38-MAPK und p44/42-ERK sowohl in semi-permissiven hMEC-1 als auch in den permissiven UT-7/EPO-Zellen untersucht. Weiterhin wurde analysiert, welche Rolle die NTP-Bindedomäne des B19V-NS1 anhand einer B19V-NS1-K334E-Mutante für die Aktivierung der MAPK/ERK spielt. Die Expression von MAPK-assoziierten Zielgenen wurde in einer konditionalen stabilen NS1-überexprimierenden hMEC-1-Zelllinie durch RT²-Profiler Array Analysen quantifiziert.

3.1.1 Real-Time PCR zum Nachweis der mRNA-Expression von B19V-NS1

In einem ersten Schritt wurde untersucht, ob nach transienter Transfektion von humanen ECs (hMEC-1) mit dem Konstrukt pcDNA-NS1 die Expression von B19V-NS1 erfolgt. Die Darstellung der NS1-Expression war nur auf RNA-Ebene möglich, da zum Zeitpunkt der Durchführung der Experimente dieser Arbeit keine NS1-Antikörper verfügbar waren. hMEC-1-Zellen wurden mit pcDNA-NS1 und dem Kontrollvektor pcDNA3.1 transient transfiziert (s. Kap. 2.3.1). Die Zellen wurden in einer Zeitkinetik an aufeinanderfolgenden Zeitpunkten von 12 - 96 h geerntet (s. Kap. 2.3.1) und die gesamte RNA extrahiert. Die extrahierte RNA wurde darauf in cDNA umgeschrieben (s. Kap. 2.4). In einer TaqMan-PCR wurde die NS1-Expression quantitativ und relativ zum Haushaltsgen ATP-Synthase 6 vermessen (s. Kap. 2.4.2). Die Auswertung erfolgte über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit dem Wert nicht-transfizierter hMEC-1-Zellen als Ausgangswert (= „1“, s. Kap. 2.5).



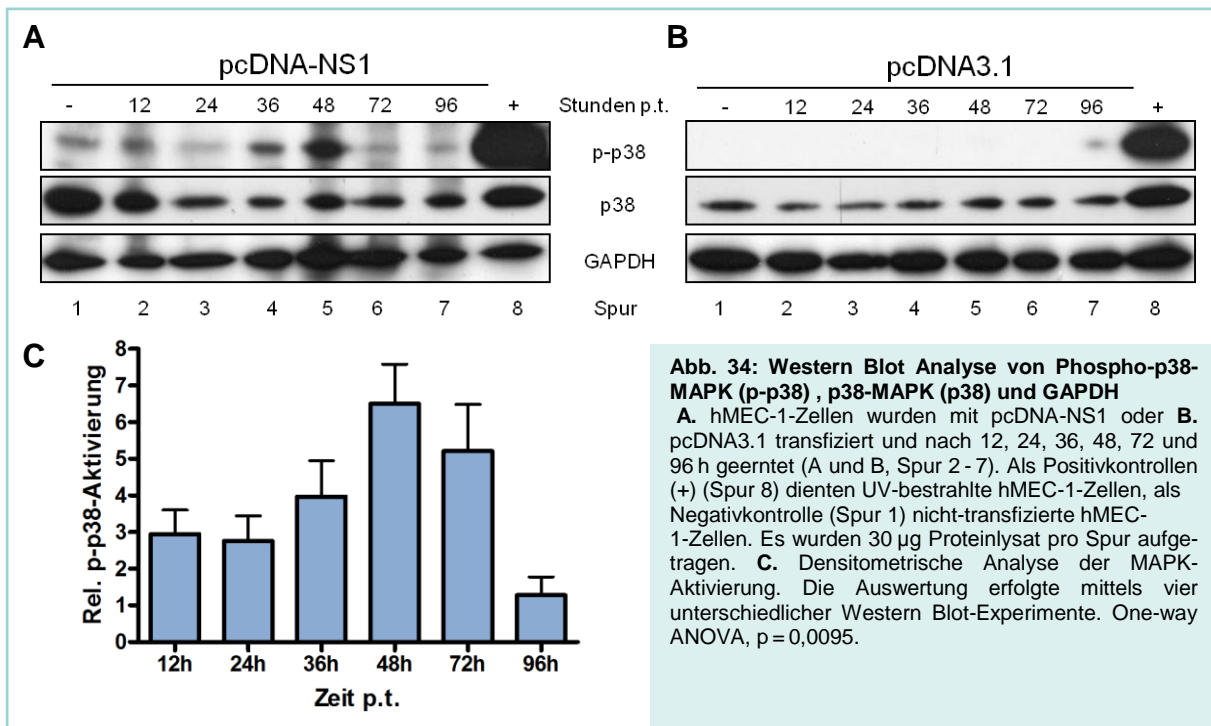
Die NS1-mRNA-Expression in hMEC-1-Zellen nach transienter B19V-NS1-Transfektion konnte im Vergleich zu den Kontrollen ohne B19V-NS1 über den gesamten Zeitverlauf von

12-96 h nachgewiesen werden (s. Abb. 33). Nach dem Nachweis der Expression von B19V-NS1 in transfizierten hMEC-1-Zellen wurde die Auswirkung der Expression des B19V-NS1-Gens auf die Aktivierung der p38-MAPK untersucht.

3.1.2 Aktivierung von p38-MAPK nach Expression von B19V-NS1 in hMEC-1

Um eine Aktivierung von p38-MAPK durch B19V-NS1 nach Transfektion in endothelialen Zellen zu analysieren, wurden transiente Transfektionsexperimente in hMEC-1-Zellen mit folgenden Western Blot Analysen durchgeführt (s. Kap. 2.7). Hierbei wurde die Phosphorylierung von Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸² (lokalisiert in der Aktivierungsschleife) der p38-MAPK untersucht.

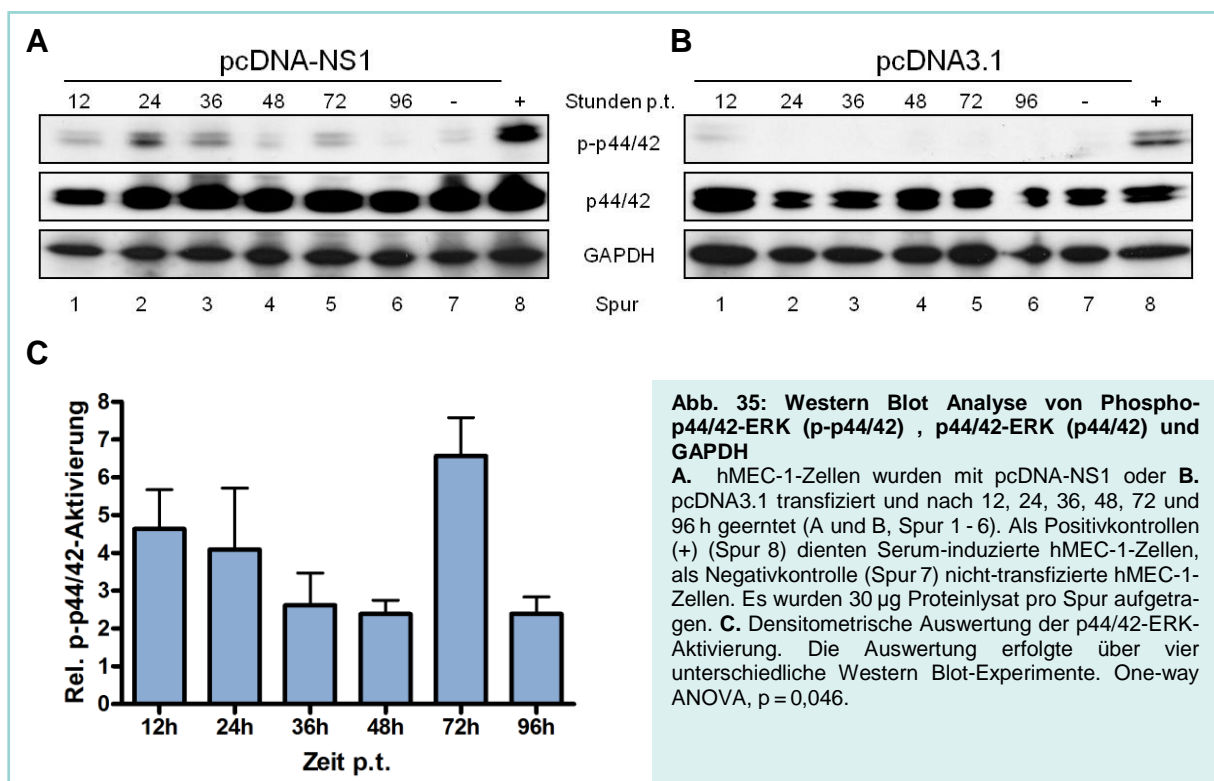
hMEC-1-Zellen wurden mit pcDNA-NS1 transfiziert und nach 12 - 96 h geerntet. Nach Durchführung der Experimente zu Aktivierung von p38-MAPK ergaben sich in densitometrischen Messungen über vier Western Blot Analysen eine Aktivierung der p38-MAPK 12 h p.t. durch B19V-NS1, die nach 24 h minimal schwächer wurde, dann aber über 36 h bis zu einem Maximum bei 48 h stetig zunahm (s. Abb. 34A, Spur 2 - 5; Abb. 34C). Eine starke Aktivierung von p38-MAPK hielt bis zum Zeitpunkt 72 h p.t. mit B19V-NS1 an und sank nach 96 h wieder auf das nicht aktivierte Ausgangsniveau ab. Nach Transfektion des Kontrollvektors pcDNA3.1 zeigte sich zu keinem Zeitpunkt eine Aktivierung von p38-MAPK (Abb. 34B, Spur 2-7).



3.1.3 Aktivierung von p44/42-ERK nach Expression von B19V-NS1 in hMEC-1

In nächsten Experimenten wurde der Einfluss von B19V-NS1 auf die mit der p38-MAPK vernetzten p44/42-ERK überprüft. Dazu wurde eine mögliche Aktivierung von p44/42-ERK durch Phosphorylierung an Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ (lokalisiert in der Aktivierungsschleife) nach B19V-NS1-Expression in humanen ECs in Western Blot Analysen untersucht (s. Kap. 2.7).

Um eine potentielle p44/42-ERK-Aktivierung durch B19V-NS1 zu ermitteln, wurden hMEC-1-Zellen mit pcDNA-NS1 transient transfiziert und nach 12 - 96 h geerntet. Abb. 35A stellt das Ergebnis der Aktivierung von p44/42-ERK durch B19V-NS1-Expression in einer repräsentativen Western Blot Analyse dar. Eine Aktivierung von p44/42-ERK durch die Expression des B19V-NS1-Proteins in hMEC-1-Zellen konnte bereits schwach nach 12 h (Abb. 35A, Spur 1) und einem ersten Maximum nach 24 h (Abb. 35A, Spur 2) beobachtet werden. Die Signalstärke des aktivierten p44/42-ERK fiel 36 h bis 48 h p.t. von B19V-NS1 wieder ab (Abb. 35A, Spuren 3 u. 4), erreichte jedoch 72 h p.t. ein erneutes Maximum (Abb. 35A, Spur 5). Zum Zeitpunkt 96 h p.t. von B19V-NS1 war keine Aktivierung von p44/42-ERK mehr zu beobachten (Abb. 35A, Spur 6). Die Ergebnisse aus dieser Untersuchung konnten in densitometrischen Vermessungen (Abb. 35C) aus vier Western Blot Analysen bestätigt werden, wobei nach 12 h - 24 h ein erstes Maximum und nach 72 h übereinstimmend ein zweites Maximum der Aktivierung von p44/42-ERK p.t. mit B19V-NS1 gezeigt werden konnte. In den durchgeführten Kontrollexperimenten zur p44/42-ERK-Aktivierung konnte mittels des pcDNA3.1 Kontrollkonstrukts ohne B19V-NS1 keine signifikante Aktivierung von p44/42-ERK beobachtet werden (Abb. 35B, Spuren 1 - 6).

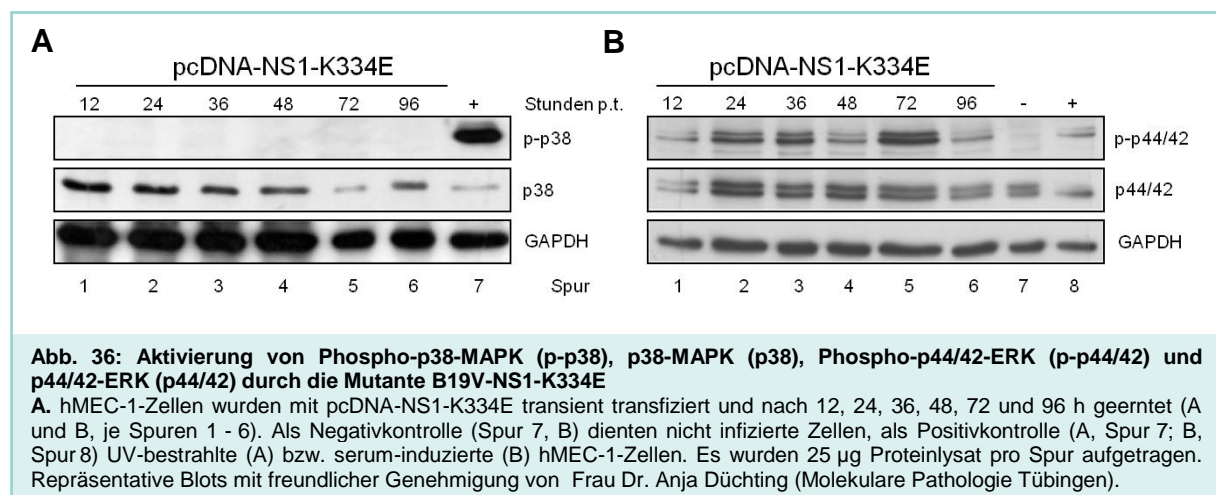


3.1.4 Bedeutung der NTP-Domäne in B19V-NS1-Genom für die Modulation der MAPK-Signaltransduktion

Das NTP-Bindemotiv befähigt B19V-NS1 an virale und zelluläre DNA zu binden. Mutationen in diesem Bereich sind mit einer Reduktion der Zytotoxizität und apoptotischen Wirkung von NS1 durch den Verlust der NTP-Bindfähigkeit verbunden (Momoeda et al. 1994). Um einen möglichen Zusammenhang der NTP-Domäne und der NS1-induzierten Aktivierung der MAPK-Signaltransduktion zu untersuchen, wurden Transfektionsexperimente mit einer neu generierten artifiziellen NTP-Mutante pcDNA-NS1-K334E in humanen ECs durchgeführt und die Regulierung von p38-MAPK und p44/42-ERK mit Hilfe einer Zeitkinetik von 12 - 96 h p.t. in Western Blot Experimenten untersucht. Diese Experimente wurden in Zusammenarbeit mit Frau Dr. Anja Düchting (Molekulare Pathologie Tübingen) durchgeführt.

Nach transients Transfektion von hMEC-1-Zellen mit der pcDNA-NS1-K334E-Mutante (s. Kap. 2.3.1) konnten mittels funktioneller Zellkulturexperimenten und anschließenden Western Blot Analysen gezeigt werden, dass im Gegensatz zum Wildtyp-NS1 (pcDNA-NS1, s. Abb. 34A, Spur 2 - 7) die NTP-Mutante p38-MAPK nicht aktiviert (Abb. 36A, Spur 1 - 6). Die Hochregulation und Aktivierung der Phospho-p44/42-ERK nach der Expression von pcDNA-NS1-K334E ist jedoch vergleichbar mit der Aktivierung nach Transfektion mit dem Wildtyp pcDNA-NS1-Konstrukt in hMEC-1-Zellen. Hier zeigt sich ein ähnliches biphasisches Aktivierungsmuster mit Maxima bei 24/36h und 72h (Abb. 36B, Spur 2/3 und 5).

Somit zeigte sich, dass die funktionelle Mutation der NTP-Bindestelle in B19V-NS1 keinen Einfluss auf die Regulierung der p44/42-ERK-Aktivierung, jedoch auf die Aktivierung und Dysregulation der p38-MAPK hat.

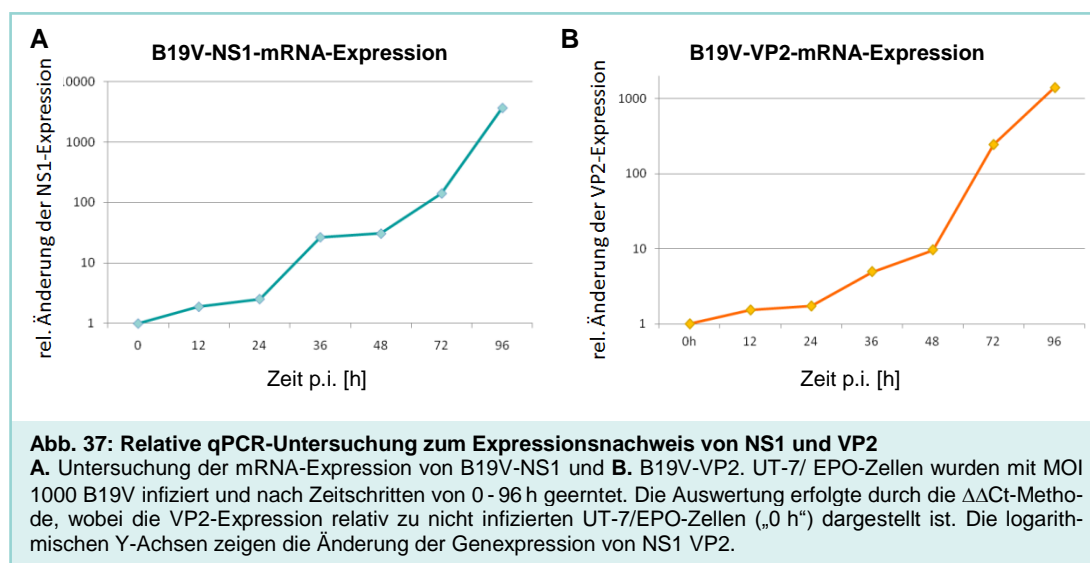


3.1.5 Real-Time PCR zum Nachweis von B19V-NS1- und B19V-VP1/2-mRNA-Expression in B19V- infizierten UT-7/EPO-Zellen

Bei einer B19V-Infektion in permissiven Zellen wie den UT-7/EPO wird neben NS1 auch VP1/2 exprimiert. Da die parvovirale Genexpression und deren Auswirkungen auf den Zellmetabolismus in permissiven und semi-permissiven Zellen verschieden sein können (Liu et al. 1992), wurde der Einfluss der B19V-Infektion in der permissiven Zelllinie UT-7/EPO auf die Modulation des MAPK-Signalwegs untersucht, um einen Vergleich zur NS1-Expression und deren Auswirkung auf den MAPK-Signalweg in semipermissiven Zellen herzustellen.

Zur Überprüfung der unter Kap. 3.1.2 bis 3.1.4 nachgewiesenen Befunde der Aktivierung der inflammatorischen MAPK- und ERK-Signalwege durch B19V-NS1 in semipermissiven hMEC-1-Zellen wurde im Folgenden die Aktivierung der MAPK- und ERK-Signalwege mittels Infektion mit B19V (im Kontext des B19V-Gesamtgenoms) in UT-7/EPO-Zellen analysiert. Dazu wurde in einem ersten Schritt die erfolgreiche B19V-Infektion der UT-7/EPO-Zellen überprüft. Hierzu wurde die Expressionen von B19V-NS1- und -VP2-mRNA nach B19V-Infektion dargestellt. UT-7/EPO-Zellen wurden mit B19V-Partikeln infiziert (s. Kap. 2.3.2) und in einer Zeitkinetik von 12 - 96 h p.i. geerntet. Anschließend wurde virale RNA extrahiert und in cDNA revers transkribiert. In einer TaqMan-PCR wurde die Expression von NS1 und VP1/2 quantitativ und relativ zum Haushaltsgen ATP-Synthase 6 vermessen (s. Kap. 2.4.2). Die Auswertung erfolgte über die $\Delta\Delta\text{Ct}$ -Methode mit dem Wert nicht-infizierter UT-7/EPO-Zellen als Ausgangswert (= „1“, s. Kap. 2.5).

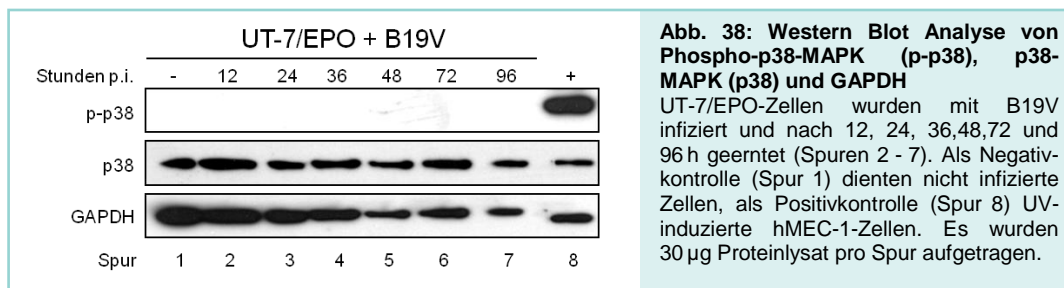
Es konnte gezeigt werden, dass die NS1-Expression bereits 12 h nach B19V-Infektion detektierbar ist und bis 96 h stetig zunimmt (Abb. 37A). Die VP2-Expression steigt signifikant nach 36 h nach der Infektion an und nimmt dann zwischen 48 und 72 h stark zu (Abb. 37B).



3.1.6 Aktivierung von p38-MAPK nach Infektion von permissiven UT-7/EPO mit Parvovirus B19

Um die Aktivierung von p38-MAPK durch B19V-Infektion in permissiven UT-7/EPO-Zellen zu analysieren, wurde die Phosphorylierung von Thr¹⁸⁰/Tyr¹⁸² mittels Western Blot-Analysen untersucht (s. Kap. 2.7). Die Zellen wurden mit einer MOI von 1000 infiziert und in einer Zeitkinetik von 12-96 h p.i. geerntet.

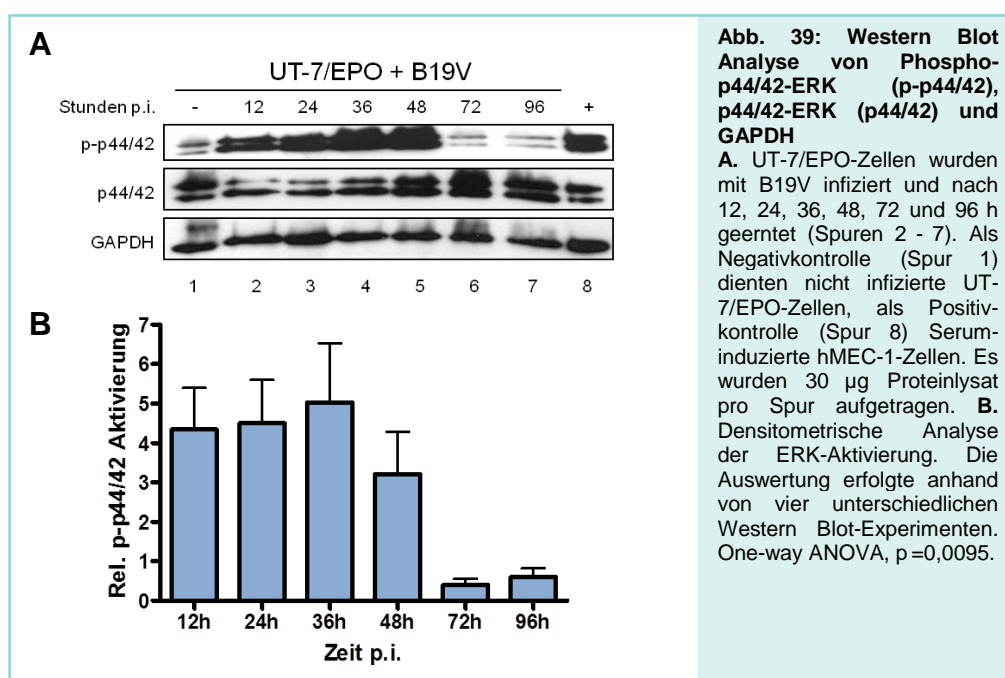
Zu keinem der untersuchten Zeitpunkte konnte eine signifikante Aktivierung durch Phosphorylierung von p38-MAPK nachgewiesen werden (Abb. 38, Spur 2 - 7). Dies gilt sowohl für den repräsentativen Western Blot in Abb. 38 als auch für alle weiteren durchgeführten vier Western Blot Analysen. Die mitgeführte Positivkontrolle in Form eines Zelllysats aus UV-bestrahlten hMEC-1-Zellen (s. Kap. 2.7.2.2) belegen eine Funktionalität der Western Blot Analyse für p38-MAPK (Abb. 38, Spur 8).



3.1.7 Aktivierung von p44/42-ERK nach Infektion von permissiven UT-7/EPO mit Parvovirus B19

In weiteren Experimenten wurde der Einfluss der B19V-Infektion auf die Aktivierung von p44/42-ERK durch Phosphorylierung an Thr²⁰²/Tyr²⁰⁴ in UT-7/EPO-Zellen untersucht. Die Megakaryozyten UT-7/EPO wurden mit einer MOI von 1000 mit B19V infiziert und nach 12-96 h p.i. geerntet.

In Western Blot Analysen zeigte sich, dass p44/42-ERK in einer Initialphase zwischen 12 h und 48 h signifikant aktiviert wird (Abb. 39A, Spur 2 - 5). Nach 72 h fällt das Signal für die Phosphorylierung dramatisch ab (Abb. 39A, Spur 6). Nach 72 - 96 h ist keine signifikante Aktivierung von p44/42-ERK nach Infektion mit B19V mehr detektierbar (Abb. 39A, Spur 6 + 7).



3.1.8 Untersuchungen zur Expression von MAPK-assozierten Genen

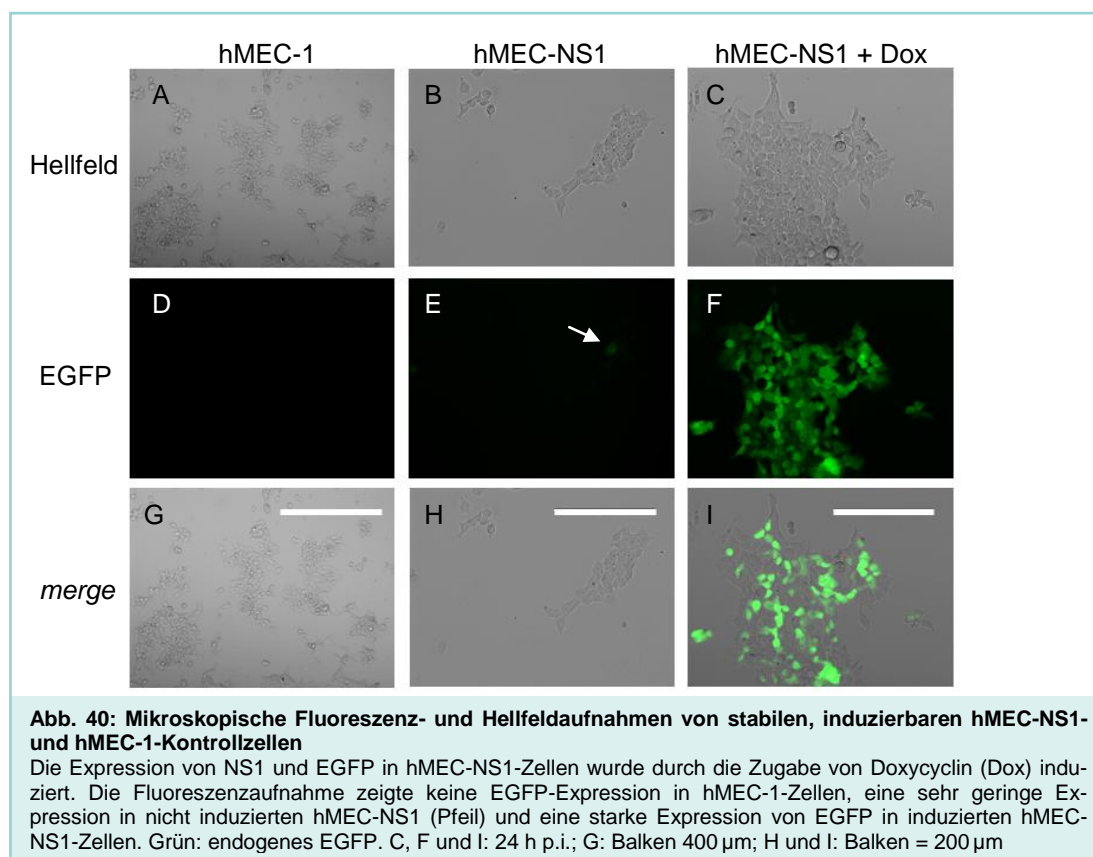
Im Rahmen dieser Arbeit konnte eine Regulation und Aktivierung des MAPK- und ERK-Signalwegs durch B19V-NS1 in ECs auf Proteinebene belegt werden. Diese Regulation kann mit einer veränderten Genexpression von Zielgenen der MAPK-Signalkaskaden einhergehen. Um eine mögliche Beeinflussung dieser Gene durch B19V-NS1 zu analysieren, wurde in einer stabilen transgenen hMEC-1 Zelllinie die NS1-Expression induziert und durch mikroskopische Fluoreszenzaufnahmen sowie *Real-Time* qPCR verifiziert. 24 h p.i. wurde ein Expressions-Profil der MAPK-assozierten Gene erstellt.

3.1.8.1 Nachweis der B19V-NS1-Expression in induzierten hMEC-NS1-Zellen

3.1.8.1.1 Fluoreszenzmikroskopie von induzierbaren hMEC-NS1-Zellen

Um die NS1-Protein-Expression in humanen ECs gezielt zu steuern, wurde ein spezielles konditionales Zellsystem eingesetzt. Dieses System besteht aus einer transgenen humanen Endothelzelllinie (hMEC-1), in der durch eine Kombination aus Tet-on-System und einem EC-spezifischen bidirektionalen Promotor eine konditionelle und parallele Expression von B19V-NS1 und dem Reporter gen *Enhanced green fluorescent protein* (EGFP) ermöglicht wird. Durch Zugabe von Doxycyclin wird die zeitgleiche Expression dieser beiden Gene induziert (s. Kap. 2.3.3).

Um die Expression von B19V-NS1 und EGFP zu visualisieren, wurden hMEC-NS1-Zellen durch Zugabe von Doxycyclin induziert und im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von Licht der Wellenlänge 498 nm analysiert. Die stabilen NS1-Zellen sowie hMEC-1- und nicht induzierte hMEC-NS1 hatten im Hellfeld übereinstimmend eine vergleichbare Morphologie (Abb. 40, A - C). In den hMEC-NS1-Zellen zeigte sich 24 h nach Induktion ein deutliches Fluoreszenzsignal (Abb. 40, F). hMEC-1-Kontrollzellen wiesen kein Fluoreszenz auf (Abb. 40, D). Bei nicht induzierten hMEC-NS1 konnte eine schwache Färbung detektiert werden (Abb. 40, E). Dies deutet vermutlich auf eine minimale Aktivität des bidirektionalen Promotors und eine geringfügige Expression von EGFP auch ohne Doxycyclin-Induktion hin. Dieses Phänomen der minimalen Aktivität des Tet-on Promotors wurde früher beschrieben (Zhu et al. 2002). Ob diese Beobachtung für die Expression von B19V-NS1 tatsächlich zutrifft, wurde in weiteren *Real-Time* PCRs untersucht.



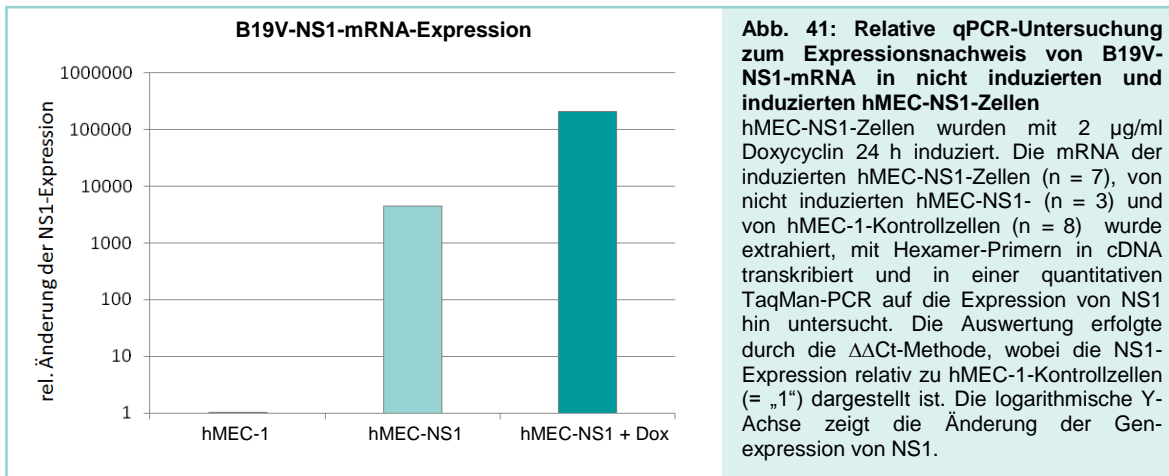
3 Ergebnisse

3.1.8.1.2 Nachweis der B19V-NS1-Expression in induzierten hMEC-NS1-Zellen

In Fluoreszenzaufnahmen konnte gezeigt werden, dass die Induktion mittels Doxycyclin zur Expression von EGFP in hMEC-1-Zellen führt. Um die Expression von B19V-NS1 auf RNA-Ebene besser darzustellen, wurde eine *Real-Time* RT-PCR durchgeführt.

Aus 24 h induzierten und nicht induzierten hMEC-NS1- sowie aus hMEC-1-Kontrollzellen wurde gesamt RNA isoliert, diese revers transkribiert und in einer quantitativen *Real-Time* RT-PCR auf die Expression B19V-NS1-mRNA untersucht (s. Kap. 2.4.2). Die Auswertung der Experimente ist in Abb. 41 als Änderung der Expression in Bezug auf die hMEC-1-Kontrolle (= „1“) dargestellt. Sowohl induzierte ($2,14 \times 10^5$ -fach) als auch nicht induzierte hMEC-NS1-Zellen ($4,5 \times 10^3$ -fach) wiesen eine signifikante B19V-NS1-Expression auf. Nach Induktion durch Doxycyclin war die Expression von B19V-NS1 etwa um den Faktor 50 erhöht im Vergleich zu nicht induzierten Zellen.

Auch ohne Zugabe von Doxycyclin scheint die bidirektionale Transkriptionseinheit minimal aktiviert zu sein. Sowohl EGFP als auch B19V-NS1-mRNA wurden in hMEC-NS1-Zellen basal exprimiert. Nach Induktion nahm die Expression von B19V-NS1-mRNA stark zu. Daher wurden für die folgenden Experimente Doxycyclin-induzierte hMEC-NS1-Zellen mit hMEC-1-Kontrollzellen verglichen, da diese im Gegensatz zu nicht induzierten hMEC-NS1-Zellen keine B19V-NS1-Expression aufwiesen.



3.1.8.2 MAPK-Genexpressions-Profilung nach B19V-NS1-Expression in humanen Endothelzellen

In den vorangegangenen Experimenten konnte gezeigt werden, dass B19V und B19V-NS1 die inflammatorische Signaltransduktion insbesondere den MAPK- und ERK-Signalweg aktivieren können und eine gewichtige Rolle bei der endothelialen Aktivierung und inflammatorischen Prozesse bei der B19V-iCMP spielen. In den folgenden Experimenten war von Interesse, welche MAPK-Signalweg-assoziierten Faktoren und Gene nach der Aktivierung

der Signalwege von Bedeutung sind. Dementsprechend wurden Zielgene der MAPK-Signaltransduktion mittels RT²-Profiler Array weiter identifiziert (s. Kap. 2.6.1).

Anhand des MAPK-Profiler Arrays kann die Regulation der Genexpression von 84 mit MAPK-assoziierten Zielgenen untersucht werden (s. Tabelle 22, Anhang). Initiale Experimente zeigten, dass die Unterschiede der Genexpression zwischen induzierten und nicht induzierten hMEC-NS1-Zellen nur marginal waren, was vermutlich auf die basale NS1-Expression in nicht induzierten Zellen zurückzuführen war (Daten nicht aufgeführt). Daher wurden in weiteren Versuchen induzierte hMEC-NS1- mit hMEC-1-Kontrollzellen verglichen.

hMEC-NS1-Zellen wurden für 24 h mit Doxycyclin induziert und zusammen mit unbehandelten hMEC-1-Kontrollzellen geerntet (s. Kap. 2.6.1). Aus beiden Zelllinien wurde die gesamte RNA isoliert, 800 ng davon mit Random Hexamer Primern in cDNA umgeschrieben und in Genexpressions-Profiler Array Experimenten eingesetzt.

Die in Abb. 42 dargestellten Ergebnisse der MAPK-Profiler Array-Analysen lassen erkennen, dass eine große Anzahl von Genen 3 x oder mehr reguliert waren. Relevant erschienen die Faktoren, deren Werte hochsignifikant verändert waren ($p < 0,05$).

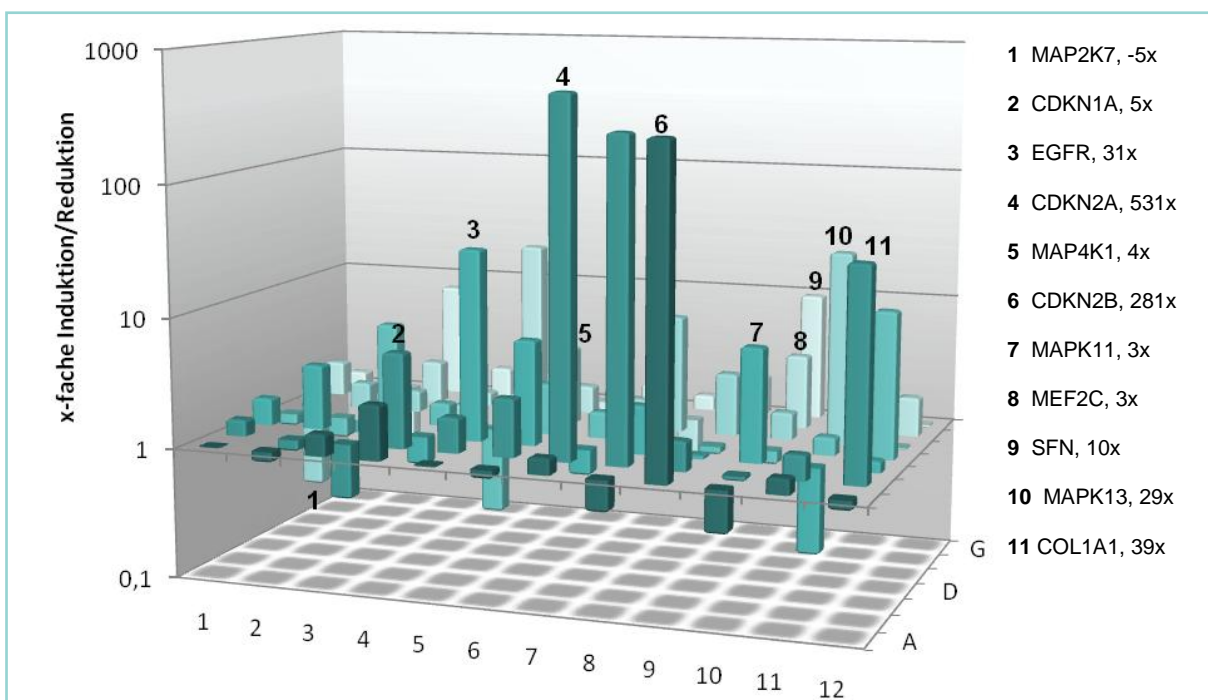


Abb. 42: Expressionsprofil von 84 Zielgenen des MAPK-Signalwegs nach Induktion von B19V-NS1

Die angegebenen Werte wurden gebildet aus der Ratio der Genexpression von induzierten NS1-hMEC-Zellen zu hMEC-1-Kontrollzellen und sind dargestellt als x-fache Induktion bzw. Reduktion. Ein Wert von 1 zeigt keine Veränderung der Genexpression bezogen auf hMEC-1-Zellen, Werte > 1 werden definiert als Induktion, Werte < 1 als Reduktion. Die X- und Z-Achse bezeichnen die Position der untersuchten Gene in der 96-Well-Platte, die logarithmische Y-Achse zeigt die Genexpressionshöhe. Markiert sind signifikant induzierte bzw. reduzierte Werte. *Student's t-test* $p < 0,05$. Liste aller untersuchten Gene dieser Array-Analyse: s. Tabelle 22, Anhang.

Viele Zielgene wiesen eine signifikant verstärkte Expression auf, darunter sind neben Kollagen (COL1A1, 39 x) Zielgene, die eine Funktion in der Zellzykluskontrolle oder Proliferation (CDKN1A, 5 x; CDKN2A, 531 x; CDKN2B, 281 x; EGFR, 31 x) und in der Antwort auf

3 Ergebnisse

zellulären Stress und pro-inflammatorische Zytokine (MAPK11, 3 x; MAPK13, 29 x) übernehmen und als Signalmoleküle fungieren (MAP4K1, 4 x; MEF2C, 3 x; SFN, 10 x). In Bezug auf alle untersuchten Gene wurde die Expression von zwei Dritteln der MAPK-assoziierten Zielgene der RT-Profiler Array-Analysen durch B19V-NS1 reguliert. Auffällig war hier, dass sich unter den Genen, die durch B19V-NS1 außerordentlich hoch reguliert wurden (> 280 x), ausschließlich solche befanden, die mit der Regulation des Zellzyklus in Verbindung stehen (CDKN2A und -B).

Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass die B19V-NS1-Expression in hMEC-1-Zellen nicht nur eine Aktivierung des p38-Proteins (s. Western Blot Analysen, Kap. 3.1.2) sondern auch eine gesteigerte Expression des p38-Gens bewirkte. Insbesondere die Expression der paralogen Isoformen der p38-MAPK (MAPK 11 = p38beta und MAPK13 = p38delta) waren signifikant erhöht (s. Abb. 42). Eine Aktivierung der Expression von p44/42-ERK (MAPK3 und -1) konnte dagegen nur minimal (>2 x) nachgewiesen werden.

Signifikant herunter reguliert wurde der Faktor MAP2K7, eine MAP Kinase Kinase, die bei der Weiterleitung der zellulären Antwort auf proinflammatorische Zytokine beteiligt ist. Im Vergleich zur hMEC-1-Kontrolle war die Expression von MAP2K7 signifikant und 5-fach supprimiert.

Mit Hilfe der MAPK Profiler Array-Analysen konnte gezeigt werden, dass die B19V-NS1-Expression in humanen ECs eine Modulation der Genexpression von knapp 30 % der untersuchten Faktoren des MAPK-Signalwegs bewirkt. Die regulierten MAPK-Zielgene konnten insbesondere der Zellzykluskontrolle (hauptsächlich Inhibition), der Stressantwort auf proinflammatorische Prozesse und der Signalweiterleitung innerhalb der MAPK-Kaskade zugeordnet werden.

3.2 Untersuchungen zum Einfluss von Parvovirus B19 auf den eNOS-Signalweg

Stickstoffoxid (NO), das durch endotheliale NO-Synthase (eNOS) gebildet wird, ist ein wirksamer Vermittler physiologischer und pathophysiologischer Signale im kardiovaskulären System und spielt unter anderem bei Prozessen wie der inflammatorischen Antwort und der vaskulären Homöostase von ECs eine wichtige Rolle (Seddon et al. 2007; Dudzinski et al. 2006). Eine Dysregulation des zellulären NO-Haushalts kann u.a. zu Inflammation, Hypoxie oder dem Verlust der endothelialen Barrierefunktion führen (Justice et al. 2000; Otani 2009; Dossumbekova et al. 2008).

B19V wurde bereits mit der Entwicklung einer endothelialen Dysfunktion (ED) in Zusammenhang gebracht (Kandolf 2004; Bültmann et al. 2003). Da bekannt ist, dass der eNOS-

Signalweg an pathologischen Prozessen der ED beteiligt ist (Goligorsky et al. 2000; Arnal et al. 1999), wurde der Einfluss von B19V auf diesen Signalweg und die damit verbundene Regulationsmechanismen untersucht, um dadurch potentielle Anhaltspunkte auf eine Dysregulation der eNOS-Signalkaskade durch die Virusinfektion zu identifizieren.

Um zu Beginn einen Gesamtüberblick über verschiedene Regulationsmechanismen und assoziierte Faktoren von eNOS zu erhalten, die durch die Expression von B19V-NS1 beeinflusst werden, wurde –ähnlich dem MAPK-Profiler-Array-Analysen– eine TaqMan-basierte Expressionsprofil-Array-Analyse durchgeführt.

3.2.1 eNOS-Genexpressions-Profiling nach B19V-NS1-Expression in humanen Endothelzellen

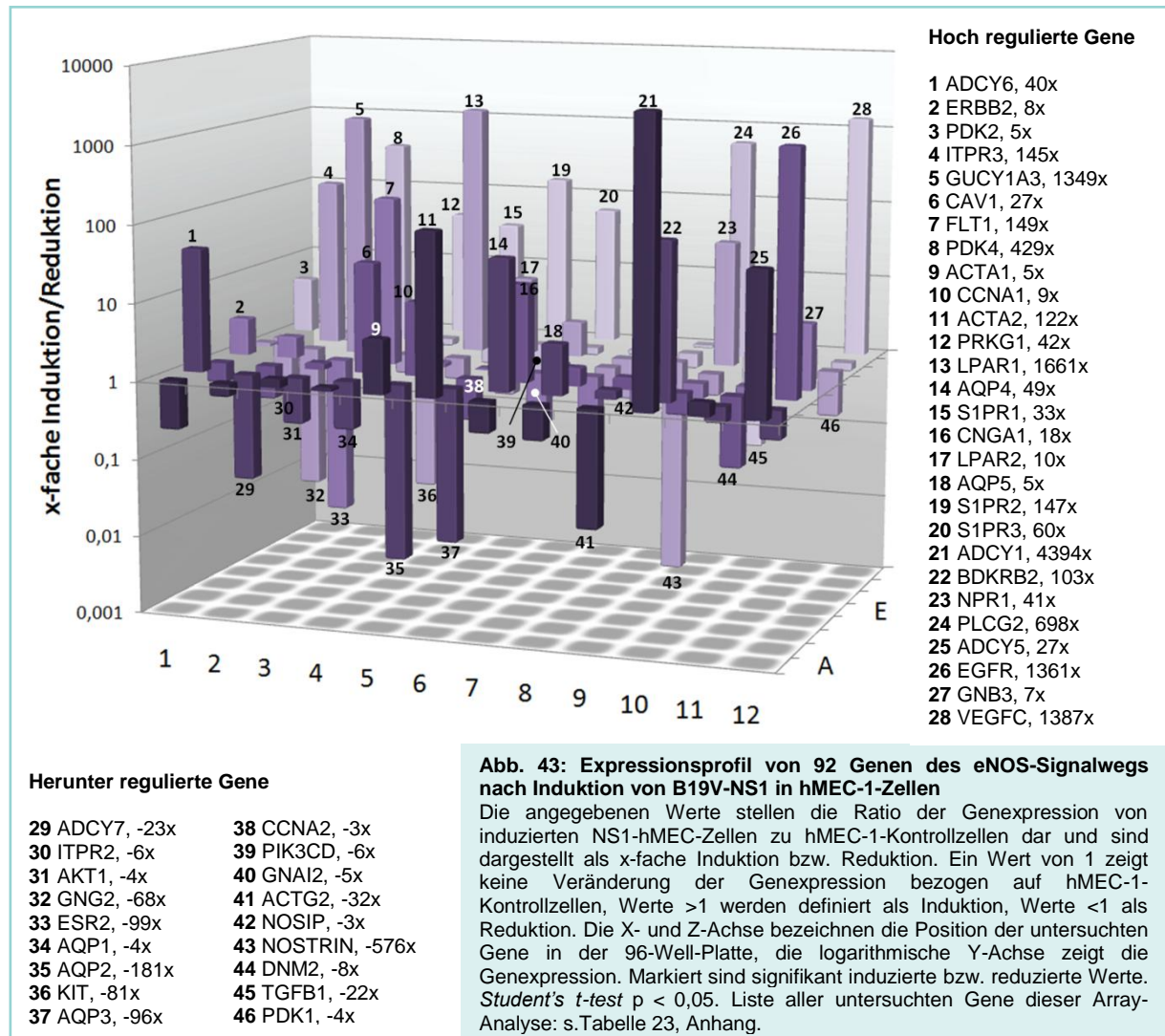
Da eNOS äußerst komplex reguliert und durch viele Faktoren beeinflusst wird (s. Kap. 0), wurde in diesen Experimenten die Expression einer Anzahl von Gene quantifiziert, die mit eNOS in Zusammenhang gebracht werden können (s. Tabelle 23, Anhang). Dazu zählen direkt und indirekt interagierende Proteine wie z.B. Calmodulin, verschiedene Stimuli und Proteine, die mit der zellulären Lokalisation von eNOS, die für die Enzymaktivität essentiell ist, assoziiert sind wie z.B. Caveolin und HSP90, sowie stromab-Faktoren, die durch eNOS oder NO reguliert werden, wie z.B. die lösliche Guanylatcyclase (sGUCY).

Wie bei der Durchführung der MAPK-Profiler Array-Analysen (s. Kap. 3.1.8.2) wurde die Expression von eNOS-assoziierten Faktoren in Doxycyclin-induzierten hMEC-NS1-Zellen mit hMEC-1-Kontrollzellen verglichen (s. Kap. 2.3.3.1). Auffallend dabei war, dass die Expression von B19V-NS1 in humanen ECs einen drastischen Einfluss auf die Hälfte der 92 untersuchten Zielgene des eNOS-Signalwegs hat.

Aus dem Diagramm in Abb. 43 wird eine starke Modulation der Expression eNOS-assoziiierter Gene durch die Expression von B19V-NS1 in ECs ersichtlich. Offensichtlich ist die signifikante Induktion der Expression ($> 3 \times$, $p > 0,05$) von 28 Genen und eine signifikante Suppression ($< -3 \times$, $p > 0,05$) von 18 Genen. Die auffälligste Gruppe, die hoch signifikant durch die Expression von B19V-NS1 hochreguliert war, sind Rezeptor-kodierende Gene. Hierzu zählen Rezeptoren für endotheliale Wachstumsfaktoren (EGFR, 1361 \times ; FLT1, 149 \times ; ERBB2, 8 \times , VEGFC, 1387 \times), für das Gewebshormon Sphingosin-1-Phosphat (S1PR1, 33 \times ; S1PR2, 147 \times ; S1PR3, 60 \times ; LPAR1, 1661 \times ; LPAR2, 10 \times), für intrazelluläres Inositol-triphosphat (ITPR3, 145 \times) und vasoaktives Bradykinin (BDKBR2, 103 \times) sowie das natriuretische Peptid (NPR1, 41 \times). Eine deutliche, teilweise über 4000-fache Steigerung der Expression konnte bei Faktoren der intrazellulären Signaltransduktion wie der β -Untereinheit des G-Protein-Komplexes (GNB3, 7 \times), daran gekoppelte Adenylatzyklen (ADCY1, 4394 \times ; ADCY5, 27 \times ; ADCY6, 40 \times), einem rezeptorverbundenen Katalysatorenzym (PLCG2, 698 \times)

3 Ergebnisse

und NO-abhängigen Downstream-Faktoren (PRKG1, 42 x; GUCY1A3, 1349 x) festgestellt werden. Weitere 5x- bis 429x-aktivierte Gene (s. Abb. 43) kodieren für Kanäle des intra- und extrazellulären Ca^{2+} - und Na^{+} -Transports (CNGA1, 18 x; ITPR3, 145 x), den Energiestoffwechsel betreffende (PDK2, 5 x; PDK4, 429 x), Aquaporine (AQP4, 49 x; AQP5, 5 x) und Zellzyklus-assoziierte Gene (CCNA1, 9 x). Die Expression von Genen, die für direkte Interaktionspartner von eNOS kodieren, wurde ebenfalls hochreguliert. α -Aktin (ACTA1, 5 x und ACTA2, 122 x) beeinflusst eNOS positiv, Caveolin (CAV1, 27 x) sorgt dagegen für dessen Repression.



Im Vergleich zur Kontrollzelllinie hMEC-1 wies etwa ein Fünftel der untersuchten Gene eine signifikant supprimierte Transkriptionsrate auf. Hierbei zeigten Faktoren der Signaltransduktion am häufigsten eine Repression der Genexpression. Dazu zählten die α - und γ -Untereinheit der G-Proteins (GNAI2, -5 x; GNG2, -68 x), Bestandteile der Signalweiterleitung (Akt1, -4 x; PIK3CD, -6 x; ADCY7, -23 x) und das Zytokin TGF- β (TGFB1, -22 x). Eine deutlich signifikante Reduktion der Genexpression (-576 x) wurde beim eNOS-Transfermolekül NOSTRIN sichtbar, das durch den Transport von eNOS innerhalb der Zelle einen

hemmenden Einfluss auf die eNOS-Aktivität hat. Ebenso in ihrer Expression reduziert waren drei Rezeptor-Gene, darunter Gene des Hormonrezeptors ESR2 (-99 x), des Rezeptors für Stammzellfaktoren KIT (-81 x) und einer Isoform des Rezeptors für intrazelluläres Inositoltriphosphat (ITPR2, -6 x). Des Weiteren wiesen Gene der Zellzykluskontrolle (CCNA2, -3 x) und des Energiestoffwechsels (PDK1, -4 x) sowie bestimmte Aquaporine (AQP1, -4 x; AQP2, -181 x; AQP3, -96 x) eine verringerte Abundanz der mRNA auf. Weitere Faktoren, die direkt mit eNOS interagieren, wurden ebenfalls in ihrer Genexpression vermindert, hierzu zählen Zielgene mit aktivierenden (DNM2, -8 x; ACTG2, -32 x) und inhibierenden (NOSIP, -3 x, NOSTRIN, -576 x) Eigenschaften.

Ganz anders als die eben beschriebenen Zielgene der distanzierteren zellulären Umgebung von eNOS, die einer deutlichen Induktion und Suppression nach B19V-NS1-Expression unterlagen, verhielt es sich mit Zielgenen der direkten Interaktionspartner von eNOS. Hier blieben interessanterweise die Transkriptionsraten aller getesteten Calmodulin-Isoformen, die für die eNOS-Katalyseaktivität essentiell sind, und die eNOS-mRNA selbst von der B19V-NS1-Expression unbeeinflusst. Ebenso zeigte sich dies bei den Chaperonen HSP90 und HSP70 sowie allen fünf untersuchten cAMP-abhängigen Proteinkinasen (PKAs), von denen jeder die eNOS-Aktivierung durch direkte Interaktion fördern.

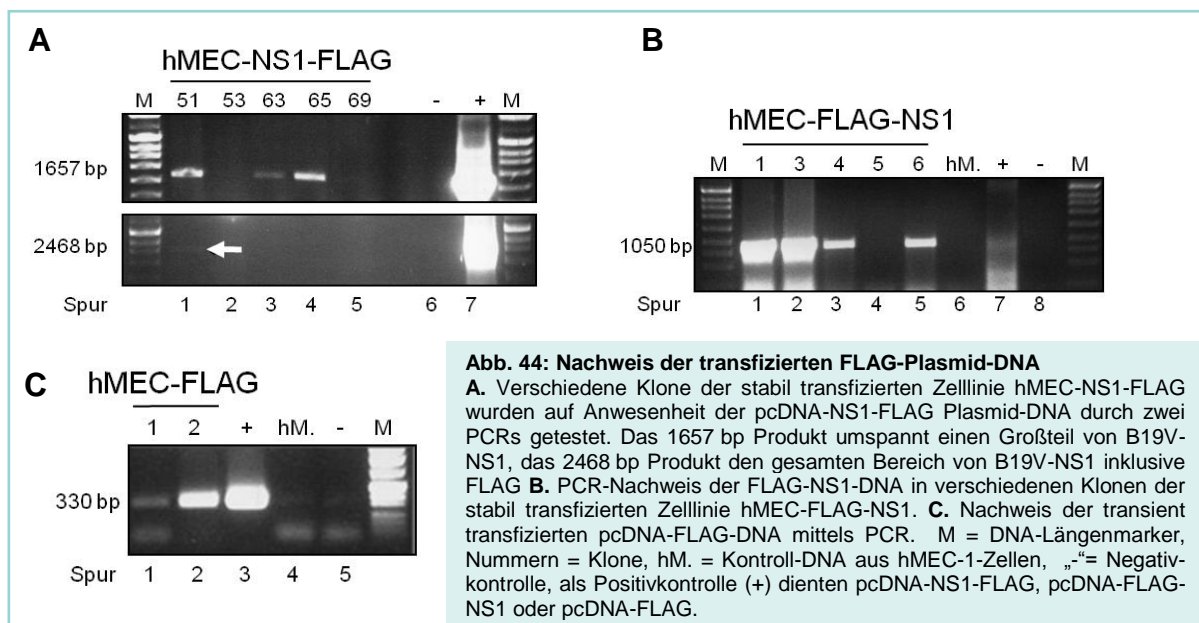
Die Experimente zur Regulation von Zielgenen des eNOS-Signalwegs haben gezeigt, dass eine Anzahl von Komponenten des eNOS-Signalwegs durch die Expression von B19V-NS1 signifikant reguliert wurde. Insbesondere war eine sehr starke Induktion der Transkription verschiedener Rezeptortypen wie z.B. Sphingosin-1-Phosphat-Rezeptoren und Bestandteile der intrazellulären Signalkaskaden wie z.B. Bestandteile des G-Proteins, sowie eine Reduktion beim inhibierenden Transfermolekül NOSTRIN zu beobachten. Die Expression von direkten Aktivatoren und eNOS selbst blieben jedoch unbeeinflusst. In weiteren Untersuchungen muss nun gezeigt werden, ob die eNOS-Aktivität auf Proteinebene durch Phosphorylierungen reguliert wird und welche Auswirkungen die B19V-NS1-induzierten transkriptionellen Modulationen der hier untersuchten Faktoren auf die Pathophysiologie der EC haben.

3.3 Bestimmung der Parvovirus B19-NS1-Protein-Interaktionspartner

Die vorangegangenen Untersuchungen haben den Einfluss von B19V-NS1 auf die inflammatorische Signaltransduktion gezeigt. Nun stellt sich die Frage, mit welchen zellulären Bestandteilen B19V-NS1 direkt interagiert. Da Identifizierung von Protein-Protein-Interaktionen einen zentralen Punkt im Verständnis der biologischen Vorgänge in lebenden Zellen darstellt, wurden zu diesem Zweck stabile transgene hMEC-1-Zelllinien hergestellt, die B19V-NS1 mit C- bzw. N-terminal fusionierter FLAG-Markierung exprimierten. Mit Hilfe der FLAG-Markierung lässt sich B19V-NS1 mit den gebundenen zellulären Interaktionspartnern aus der Zelle extrahieren, um diese in einem weiteren Schritt analysieren zu können (s. Kap. 2.8).

3.3.1 PCR-Nachweis der transfizierten pcDNA-Plasmide in humanen Endothelzellen

Für die Bestimmung der zellulären B19V-NS1 Interaktionspartner wurden durch stabile Transfektion Zelllinien generiert, die NS1-FLAG bzw. FLAG-NS1 exprimierten. Die DNA aus verschiedenen Klonen dieser Zelllinien wurde extrahiert und mittels PCR auf die Existenz der jeweils transfizierten DNA getestet (s. Kap. 2.8.6). Die Herstellung zwei unterschiedlichen Fusionsproteinen (mit C- oder N-terminalem FLAG-Tag) sollte sicherstellen, dass das Fusions-Tag nach der Proteinfaltung in mindestens einer NS1-Proteinvariante gegenüber der Proteinoberfläche exponiert ist. Nur durch ein exponiertes FLAG-Tag ist eine antikörpervermittelte Aufreinigung möglich.



In einem der untersuchten Klone der stabilen Zelllinie hMEC-NS1-FLAG (C-terminale Fusionierung) konnte der PCR-Nachweis für die vollständige NS1-FLAG-DNA erbracht werden (Abb. 44A, 2468 bp, Spur 1; s. Kap. 2.8.6.2). Bei den Untersuchungen der Zelllinie

hMEC-FLAG-NS1 (N-terminale Fusionierung) konnte die FLAG-NS1-DNA (Abb. 44B, Spur 1, 2, 3 und 5; s. Kap. 2.8.6.2) mittels PCR nachgewiesen werden. Als Kontrolle dienten hMEC-1-Zellen, die mit pcDNA-FLAG transient transfiziert wurden. Die transfizierte Plamid-DNA war durch PCR eindeutig nachweisbar (Abb. 44C, Spur 1 u. 2; s. Kap. 2.8.7).

Nach dem Nachweis von NS1-FLAG bzw. FLAG-NS1-DNA in stabilen Zellklonen wurde die Expression des NS1-FLAG bzw. FLAG-NS1 mRNA-Transkripts analysiert.

3.3.2 Nachweis der mRNA-Expression von NS1 und FLAG in stabil transgenen hMEC-NS1-FLAG bzw. hMEC-FLAG-NS1-Zellen

In den vorangehenden Experimenten wurde gezeigt, dass die stabile Transfektion der Plasmide pcDNA-FLAG-NS1 und pcDNA-NS1-FLAG in hMEC-1-Zellen erfolgreich war, da die transfizierte DNA mittels PCR nachgewiesen werden konnte. Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob die transfizierten Gene exprimiert werden. Daher wurde die Expression der Fusionsproteine FLAG-NS1 bzw. NS1-FLAG auf mRNA-Ebene analysiert. Aus den auf DNA-Ebene positiv getesteten Klonen der stabilen Zelllinien wurde die gesamte RNA isoliert, in cDNA umgeschrieben und diese mittels PCR auf die Expression von NS1-FLAG bzw. FLAG-NS1 getestet (s. Kap. 2.8.8).

Der Nachweis für die Expression von NS1-FLAG konnte in Klonen der stabilen Zelllinien hMEC-NS1-FLAG (C-terminale Fusionierung) erbracht werden (Abb. 45A, Spur 1). Auch in der transgenen Zelllinie hMEC-FLAG-NS1 (N-terminale Fusionierung) konnte die Expression von FLAG-NS1 belegt werden (Abb. 45B, Spur 1-3 u. 6-8).

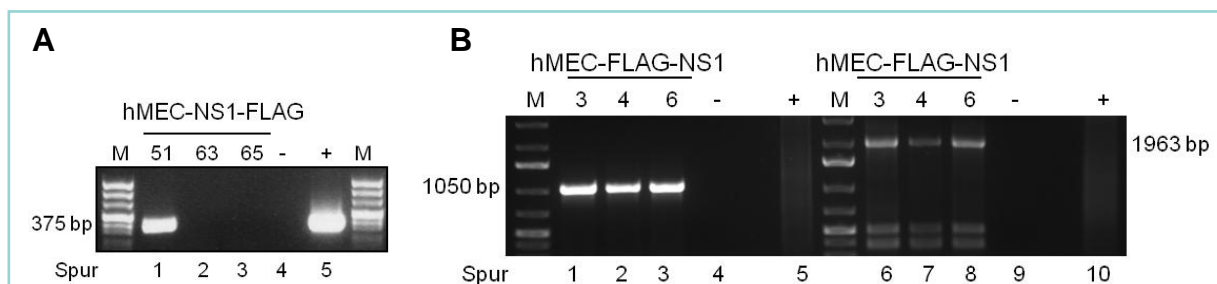


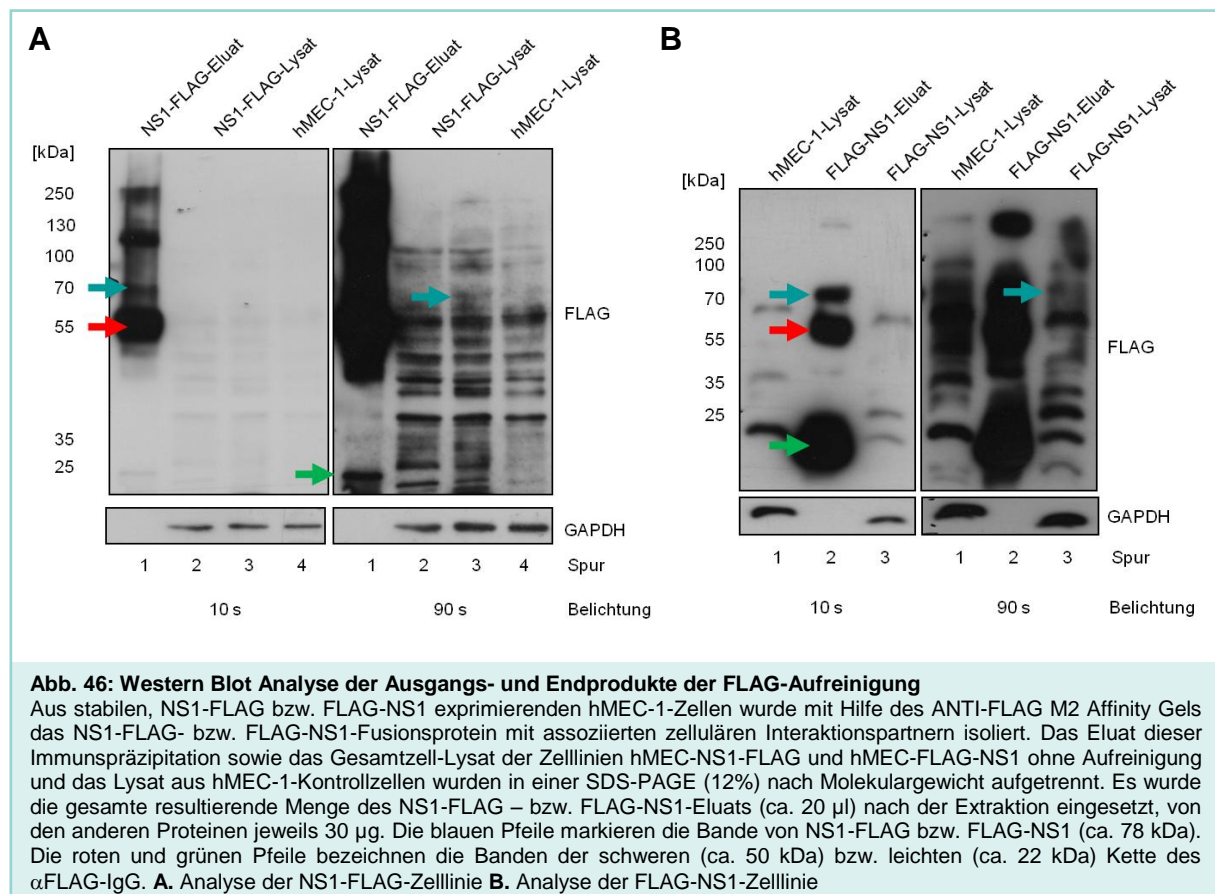
Abb. 45: PCR-Analyse der cDNA aus stabilen hMEC-NS1-FLAG- bzw. hMEC-FLAG-NS1-Zelllinien

A. Die Klone (bezeichnet als 51-65) der stabil transfizierten Zelllinie hMEC-NS1-FLAG wurden auf Expression von NS1-FLAG getestet. Das Produkt (375 bp) stellt den C-terminalen Bereich von NS1 mit fusioniertem FLAG-Tag dar. **B.** Expressions-Nachweis der FLAG-NS1 cDNA in verschiedenen Klonen der stabil transfizierten Zelllinie hMEC-FLAG-NS1. Das 1050 bp lange Produkt umschließt FLAG und den mittleren Bereich des Transkripts von B19V-NS1 (bis bp 1000), das 1963 bp lange Produkt FLAG und den Großteil von NS1. M = DNA-Längenmarker, Nummern = Klone, „-“=Negativkontrolle, als Positivkontrolle (+) dienen pcDNA-NS1-FLAG bzw. pcDNA-FLAG-NS1.

3.3.3 Western Blot Analyse zum Nachweis des FLAG-markierten NS1-Fusionsproteins

Nach dem Nachweis der transfizierten Plasmide pcDNA-FLAG-NS1 und pcDNA-NS1-FLAG und deren Expression auf mRNA-Ebene war der Nachweis des exprimierten Fusionsproteins aus NS1 und FLAG gefordert. Zu diesem Zweck wurden aus den stabil transfizierten Zelllinien hMEC-NS1-FLAG und hMEC-FLAG-NS1 Gesamtprotein extrahiert, mit Hilfe des ANTI-FLAG M2 Affinity Gels die jeweiligen NS1-Fusionsproteine isoliert und durch eine Western Blot Analyse unter Verwendung eines anti-FLAG-M2 Antikörpers nachgewiesen (s. Kap. 2.8.9 und 2.8.10).

Es konnte gezeigt werden, dass nach der Immunpräzipitation des Proteinlysats aus den Zelllinien hMEC-NS1-FLAG bzw. hMEC-FLAG-NS1 jeweils eine Bande auf der zu erwartenden Höhe des Fusionsproteins (ca. 78 kDa) NS1-FLAG bzw. FLAG-NS1 detektierbar war (Abb. 46, blaue Pfeile). Entsprechende Banden konnten ebenso, allerdings in schwächerer Form, in den Gesamtzell-Proteinlysaten nachgewiesen werden. Weiterhin konnten in den Eluaten der Immunpräzipitationen aus beiden Zelllinien deutliche Banden bei ca. 50 kDa und ca. 22 kDa (Abb. 46A, Spur 1; B, Spur 2, roter/grüner Pfeil) detektiert werden, die die schwere und die leichte Kette der ursprünglich Agarose-bead-konjugierten anti-FLAG-M2 Antikörper darstellten (Sigma-Aldrich). Weitere Bandenmuster sind unspezifischen Kreuzreaktionen des anti-FLAG-M2 Antikörpers mit zellulären Proteinen.



Der Nachweis des Haushaltsgens GAPDH diene als Kontrolle für unspezifische Bindungen. Im Gesamtzell-Lysat der beiden stabil transgenen Zelllinien und der hMEC-1-Kontrollzellen ergab sich der Nachweis von GAPDH (Abb. 46A, Spur 2 - 4; B, Spur 1 + 3, jeweils unten). Nach der durchgeführten FLAG-Immunpräzipitation konnte GAPDH nicht mehr detektiert werden (Abb. 46A, Spur 1; B, Spur 2, jeweils unten).

Das transient transfizierte und exprimierte FLAG-Peptid in den Kontrollzellen konnte nach Aufreinigung mit dem ANTI-FLAG M2 Affinity Gel in der Western Blot Analyse vermutlich aufgrund der geringen Größe von 1 kDa nicht nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Der Nachweis der Expression des NS1-Fusionsproduktes wurde somit auf RNA- und Proteinebene in den stabilen Zellkulturen erbracht. Als nächster Schritt wurde die Identifizierung von zellulären Interaktionspartnern der exprimierten NS1-Fusionsproteine untersucht.

3.3.4 Proteomanalyse mittels SILAC (*Stable isotope labeling by amino acids in cell culture*)

Um direkte zelluläre Interaktionspartner von B19V-NS1 zu identifizieren, wurde das SILAC-System angewandt (s. Kap. 2.8.11). SILAC ist eine Methode um Proteinmarkierungen für eine quantitative Proteomanalyse einzuführen und sie dadurch von unmarkierten Kontrollen unterscheiden zu können. Diese Methode basiert auf einer metabolischen Aufnahme von zugesetzten „leichten“ oder „schweren“ Aminosäuren in Proteine. Bei den „schweren“ Aminosäuren handelte es sich um nicht-radioaktives ^{13}C -Arginin und ^{13}C -Lysin, wobei die atomare Masse dieser Aminosäuren um 6 Dalton gegenüber den natürlichen ^{12}C -Aminosäuren erhöht ist. Diese Differenz je Aminosäure lässt sich durch die Massenspektrometrie (LC-MS) detektieren (Trinkle-Mulcahy et al. 2008).

Im SILAC-Ansatz wurden demnach die oben beschriebenen FLAG-NS1- und NS1-FLAG-Zellpopulationen (s. Kap. 3.3.1 - 3.3.3) sowie die hMEC-1-Kontrollzellen, die mit dem Plasmid pcDNA-FLAG transient transfiziert wurden (s. Kap. 2.8.7), in verschiedenen Wachstumsmedien kultiviert. Das Wachstumsmedium der hMEC-FLAG-NS1- und hMEC-NS1-FLAG-Zellen enthält die „schweren“ Aminosäuren ^{13}C -Arginin und ^{13}C -Lysin, das Wachstumsmedium der Kontrollzellen die natürlich vorkommenden jeweiligen ^{12}C -Formen der Aminosäuren (s. Kap. 2.8.11). Wenn den Zellen die „schweren“ Analoge der Aminosäuren anstelle der natürlichen Aminosäuren angeboten werden, nehmen sie es auf und bauen es in alle neu synthetisierten Proteine ein. So können Proteine aus den stabil transgenen Zelllinien hMEC-FLAG-NS1 und hMEC-NS1-FLAG von denen der Kontrollzellen unterschieden werden.

3.3.4.1 Isotopische Markierung der stabilen FLAG-NS1-Zelllinien, Immunpräzipitation und massenspektrometrische Messungen

Die FLAG-markierten B19V-NS1-Proteine wurden nach Kultur der Zelllinien hMEC-FLAG-NS1 und hMEC-NS1-FLAG in SILAC-Medium und Mischung mit Proteinen der FLAG-Kontrollzellen über α FLAG-Agarose-*beads* aufgereinigt (s. Kap. 2.8.11). Potentielle zelluläre Interaktionspartner, die an das B19V-NS1-Protein gebunden waren, wurden dabei mit erfasst. Alle weiteren Verarbeitungsschritte und Analysen erfolgten in Kooperation mit Frau Dr. Elke Hammer (Universitätsmedizin Greifswald), die die MS-Experimente durchführte. Die nach intensivem Waschen (s. Kap. 2.8.12) an den Agarose-*beads* gebundenen Proteine wurde mittels Trypsin proteolytisch verdaut, der Peptidextrakt von niedrigmolekularen Salzverbindungen gereinigt, massenspektrometrisch analysiert (s. Kap. 2.8.13) und durch einen Datenbankabgleich identifiziert (s. Kap. 2.8.13.1).

Als spezifische Interaktionspartner von B19V-NS1 wurden solche Proteine angesehen, die im Ansatz der NS1-FLAG bzw. FLAG-NS1 exprimierenden Zelllinien (*heavy*) mindestens 1,5-fach angereichert wurden. Proteine, die unspezifisch an die Matrix der Agarose-*beads* oder das FLAG-Peptid der Kontrollzellen banden, sollten eine Ratio von ungefähr 1 aufweisen (s. Kap. 2.8.13.2). Es konnten die Daten des FLAG-NS1-Experiments herangezogen werden. Bei der Auswertung der massenspektrometrischen Analysen zeigte sich, dass im Isolat der stabilen Zelllinie hMEC-NS1-FLAG kein B19V-NS1-Protein nachweisbar war.

Aus den Daten des hMEC-FLAG-NS1-Experiments wurden Proteine, die unspezifisch an die Affinitätsmatrix bzw. die Agarose-*beads* gebunden hatten, durch ein analytisches Filterverfahren ausgeschlossen. Dieses Filterverfahren bezieht sich auf eine umfangreiche Studie von Trinkle-Mulcahy und Kollegen (Trinkle-Mulcahy et al. 2008), in der unspezifische Bindungspartner von Affinitäts-Aufreinigungen, die bis zu 95 % der detektierten Protein ausmachen können (Trinkle-Mulcahy 2012), identifiziert und aufgelistet wurden. In der vorliegenden Analyse betrug der Anteil der unspezifischen Proteine 55 %. Zu diesen ausgeschlossenen Proteinen gehörten vor allem Bestandteile des Zytoskeletts, *heat shock* Proteine/ molekulare Chaperone, ribosomale Proteine und eukaryotische Translations-Faktoren. Tabelle 20 zeigt alle übrigen detektierten Proteine, die aus der NS1-Interaktionsstudie und dem beschriebenen Selektionsverfahren resultieren und somit spezifische zelluläre Interaktionspartner von B19V-NS1 darstellen.

Am häufigsten wurde B19V-NS1 detektiert, das in diesem Versuch als Positivkontrolle für die Proteinidentifizierung betrachtet wurde. Hier war die Anreicherung zwischen 10- und 20-fach und damit weit über der Anreicherung der potentiellen Interaktionspartner. Dies ist auf die Überexpression von B19V-NS1 unter dem CMV-Promotor des transfizierten Expressionsvektors zurückzuführen.

Tabelle 20: Massenspektrometrische Auswertung der Interaktionsstudien von B19V-NS1 mit zellulären Proteinen
 Detektierte Proteine sind in der linken Spalte dargestellt, daneben deren Molekulargewicht (MW). Die dritte Spalte gibt die Median-normalisierte *heavy/light*-Peptid-Ratio (H/L-Ratio) an, die vierte Spalte zeigt die Zahl der detektierten Spektren *Peptide spectrum match* (PSM), die eine Aussage über die Abundanz der Proteine in der Probe machen. Die H/L-Ratio und die PSMs stellen die Durchschnittswerte aus zwei Replikaten dar.

Protein	MW [kDa]	H/L Median-norm.	#PSMs
Non-structural protein NS1 (B19V-NS1)	74,1	16,43	14,5
<i>Prostaglandin reductase 1</i> (PTGR1)	35,8	5,24	2,0
<i>Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1</i> (ANKFY1)	128,3	3,01	11,5
<i>Transcription factor E2F7</i> (E2F7)	99,8	3,06	3,5
<i>Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3</i> (CAMPSAP3)	134,7	2,78	4,0
<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12</i> (PSMD12)	52,9	2,24	2,5
<i>Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2</i> (FCR2)	74,2	1,70	10,5
<i>Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit</i> (RPA1)	68,1	1,68	88,5
<i>PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2</i> (GIGYF2)	150,0	1,66	13,0
<i>6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2</i> (PFKFB2)	58,4	1,79	15,0
<i>DNA ligase 3</i> (LIG3)	112,8	1,82	6,5
<i>General transcription factor II-I</i> (GTF2I)	112,3	0,83	203,0

Neben diesem erwarteten Befund wurden elf zelluläre Proteine als potentielle direkte Interaktionspartner von B19V-NS1 identifiziert. Wegen des hohen Peptid-Ratio-Werts von 5,24 am auffälligsten war der Nachweis der anti-inflammatorischen Prostaglandin-Reduktase 1 (PTGR1), das bei Asthma, Allergiereaktionen und Inflammationen eine Rolle spielt. Die Faktoren *Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2* (FXR2), *Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1* (ANKFY1) und *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12* (PSMD12) sind bei Synthese, Transport und Abbau von Proteinen beteiligt. ANKFY1 und PSMD12 waren stärker angereichert, mit Peptid-Ratios von 3,01 und 2,24.

In der Gruppe der DNA-modifizierenden Proteine zeichnete sich neben der DNA Ligase 3 (LIG3) die *Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit* (RPA1) als hoch abundant mit einem PSM von 88,5 aus. Weitere identifizierte mögliche Interaktionspartner von NS1 waren -in Reihenfolge mit absteigenden Protein-Ratios- der S-Phase inhibierende Transkriptionsfaktor E2F7 (E2F7; 3,06), das Zytoskelett-assoziierte *Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3* (CAMPSAP3; 2,78), die 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-biphosphatase 2 (PFKFB2, 1,79) und das mit Grb-interagierende *PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2* (GIGYF2; 1,66).

3 Ergebnisse

Das Phosphoprotein *General transcription factor II-1* (GTF2I) nimmt bei der Datenauswertung eine Sonderstellung ein. Dessen Protein-Ratio von 0,89 fällt unter eins der Ausschlusskriterien, auffällig ist jedoch die extrem hohe Abundanz des Proteins (PSM = 203,0), was entweder auf eine große Affinität zum *FLAG-Tag* spricht oder für eine starke dynamische Bindung an das NS1-Protein.

Zusammenfassend wurden durch die SILAC-Experimente mit nachfolgender massenspektrometrischer Analyse elf potentielle direkte zelluläre Interaktionspartner des B19V-NS1-Proteins in ECs ermittelt. Diese spezifischen Proteine konnten unter anderem Funktionen in DNA- und Protein-Prozessierung sowie Prozessen zugeordnet werden, die mit Inflammation und Zellzykluskontrolle assoziiert sind.

3.4 Mutationsanalysen von Parvovirus B19

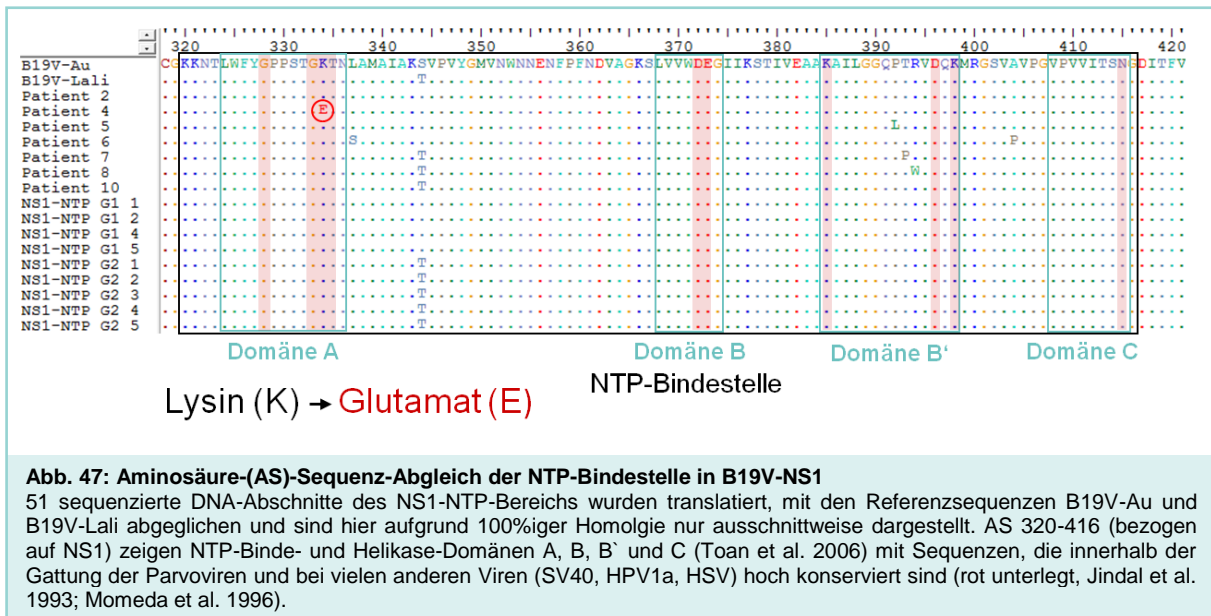
Eine hohe Mutationsrate ist charakteristisch für Mitglieder der *Parvoviridae* (Lukashov und Goudsmit 2001; Shackelton et al. 2005). Genetische Virusvarianten können mit viralen Prozessen wie beispielsweise der Virus-Replikation oder -persistenz assoziiert sein und somit die klinische Manifestation einer Infektion beeinflussen (Parsyan et al. 2007). Die funktionelle NTP-Domäne des Effektorproteins B19V-NS1 spielt eine wichtige Rolle für den viralen Replikationszyklus, ist aber auch mit den zytotoxischen Eigenschaften dieses Proteins verbunden (Gorbalenya und Koonin 1989; Momoeda et al. 1994). Mutationen im Sequenzbereich der NS1-NTP-Domäne können die Funktion des Proteins beeinflussen. Daher wurden patientenspezifische Isolate auf Mutationen in der NS1-NTP-Domäne analysiert und mit klinischen Daten korreliert. Da zudem bei diesen Analysen eine erhöhte Sequenzvarianz des B19V-Genotyps 2 beobachtbar war, wurde der gesamte kodierende Bereich mit der Sequenzvariabilität des kodierenden Bereichs des B19V-Genotyps 1 verglichen, um das Ausmaß der intergenotypischen und intragenotypischen Differenzen zu bestimmen. Bei weiteren Untersuchungen der hochvariablen NS1-VP1u-Region des Genotyps 2 wurde die Differenzierung in zwei potentielle Subtypen untersucht.

3.4.1 Identifizierung von Mutationen in konservierten Bereichen der NS1-NTP-Bindestelle

Um natürlich vorkommende funktionsverändernde Mutationen und deren potentielle Auswirkungen auf die klinische Manifestation zu identifizieren, wurde die Sequenz der 272 bp umfassenden NTP-Bindestelle aus B19V-NS1 von 51 patientenspezifischen B19V-Isolaten mit B19V-Genotypen 1 und -2 in einem Sequenzabgleich analysiert (s. Kap. 2.9.2.1). In

diesen Analysen zeigte sich, dass der NS1-NTP-Bereich einen hohen Grad an Sequenzkonservierung aufwies.

Abb. 47 veranschaulicht einen Teil des Abgleichs, der exemplarisch für alle 51 sequenzierten NS1-NTP-Bereiche steht und jede aufgetretene Mutation darstellt. Die Sequenzen unterschieden sich auf Nukleotidebene nur um 0,9% bei Genotyp 1 bzw. 1,5% bei Genotyp 2 und auf Ebene der Aminosäuren nur um 0,1% bzw. 0,2% voneinander.



Obwohl Mutationen in dem Genomabschnitt der NTP-Bindestelle von B19V-NS1 (Position 1415 nt – 1687 nt, bezogen auf GenBank M13178), der aus den Unterdomänen A, B, B' und C (s. Kap. 1.5.1.1) besteht, selten auftraten, waren in diesen Untersuchungen Aminosäuresubstitutionen nachweisbar. Mutationen konnten verstärkt in Genotyp 2 (fünf verschiedene Punktmutationen) im Vergleich zu Genotyp 1 (zwei verschiedene Punktmutationen) detektiert werden. Am auffälligsten bei einer der untersuchten Sequenzen war das Auftreten einer Basenpaarmutation (1000 nt bezogen auf B19V-NS1, 1426 nt bezogen auf M13178, AAA zu GAA), die eine Aminosäuresubstitution eines positiv geladenen Lysins gegen ein neutrales Glutamat auf Position 334 (=K334E; s. Abb. 47) zur Folge hatte. Diese befand sich innerhalb der hoch konservierten und für die NTP-Funktion essentiellen A-Domäne. Eine Mutation an dieser Stelle führt zum Funktionsverlust der NTP-Bindestelle und zur Eliminierung der zytotoxischen Effekte von B19V-NS1 (Momoeda et al. 1994).

Weitere Mutationen waren in weniger konservierten Regionen des NS1-NTP-Bereichs nachweisbar. Am häufigsten erschien die Mutation auf Position 344 (Threonin zu Serin), die jedoch auf die natürliche Varianz zwischen den Genotypen zurückzuführen war. An der Domäne B' (s. Abb. 47) traten drei verschiedene Mutationen auf: Prolin zu Leucin (P392L), Threonin zu Prolin (T393P) und Arginin zu Tryptophan (R394W). An der Grenze der

3 Ergebnisse

A-Domäne befindet sich eine Mutation von Leucin zu Serin (L337S) und weiter *downstream* auf Position 404 konnte eine Aminosäuremutation von Alanin zu Prolin (A404P) detektiert werden.

Da beschrieben ist, dass die Mutation K334E die NTP-Bindung von NS1 inaktiviert (Nakashima et al. 2006) und die Zytotoxizität von NS1 komplett beseitigt (Momoeda et al. 1994), wurde dieser virale Genotyp dem klinischen Phänotyp des Patienten zugeordnet. Der kritische Bericht des Befundes dieses Patienten beschrieb ältere Myokardschädigungen, jedoch keine akute oder chronische Myokarditis und kein Auftreten von signifikanter entzündlicher Begleitaktivität der immunhistologisch nachgewiesenen aktivierten Makrophagen. Die marginale B19V-Viruslast lag unterhalb der qPCR-Nachweisgrenze, was auf eine latente, geringgradige B19V-Persistenz schließen ließ. Das Biopsiematerial, das eine B19V-Variante mit defekter NTP-Bindestelle in sich trug, hatte somit keine Anzeichen einer Entzündungsreaktion vorzuweisen.

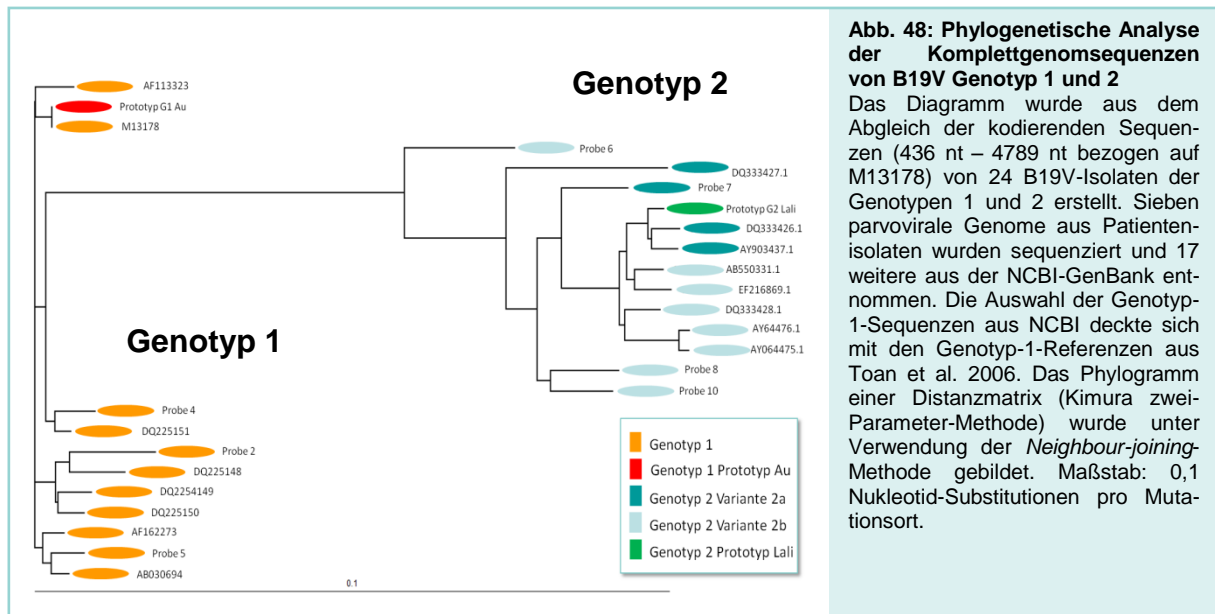
Die funktionsverändernde Mutation K334E konnte in einer Probe identifiziert und mit einem nicht-inflammatorischen klinischen Bild assoziiert werden. Die generell erhöhte Variabilität des Genotyps 2, die u.a. in dieser Mutations-Studie beobachtet wurde, ergab Hinweise auf eine mögliche Gliederung in Subtypen. Daher wurde die Variabilität von Genotyp 2 im Vergleich zu Genotyp 1 und in Bezug auf den gesamten kodierenden Genombereich von B19V in weiteren Experimenten genauer untersucht.

3.4.2 Sequenzanalysen des kodierenden Bereichs von Parvovirus B19 Genotyp 1 und 2

Um die Sequenzvariabilität zwischen den Kompletengenomen des B19V-Genotyps 1 und Genotyps 2 zu bestimmen, wurden patientenspezifische DNA-Isolate des Genotyps 1 (n=3) und 2 (n=4) vollständig sequenziert (s. Kap. 2.9.2.2). Der kodierende Bereich umfasst einen 4353 bp langen Abschnitt des B19V-Genoms, der offene Leseraster für die Gene NS1, VP1 und VP2 enthält. Die Sequenzen wurden mit jeweils acht bereits veröffentlichten Referenzsequenzen des Genotyps 1 (*NCBI-GenBank accession numbers* AB030694, AF113323, AF162273, M13178, DQ225148, DQ225149, DQ225150, DQ225151, wie Toan et al. 2006a) und des Genotyps 2 (AB550331.1, AY64476.1, AY064475.1, DQ333428.1, DQ333426.1, EF216869.1, AY903437.1, DQ333427.1) sowie den beiden Prototypsequenzen B19V-Au (Genotyp 1) und B19V-LaLi (Genotyp 2) in einem Nukleotid-Abgleich miteinander verglichen. Die Auswertungen des Sequenzabgleichs der kodierenden Bereiche von B19V sind in Abb. 48 und Abb. 49 dargestellt.

In Abb. 48 ist der Sequenzabgleich der kodierenden Bereiche der untersuchten B19V-Genotypen 1 und 2 anhand einer phylogenetischen Analyse dargestellt. Die sequenzierten

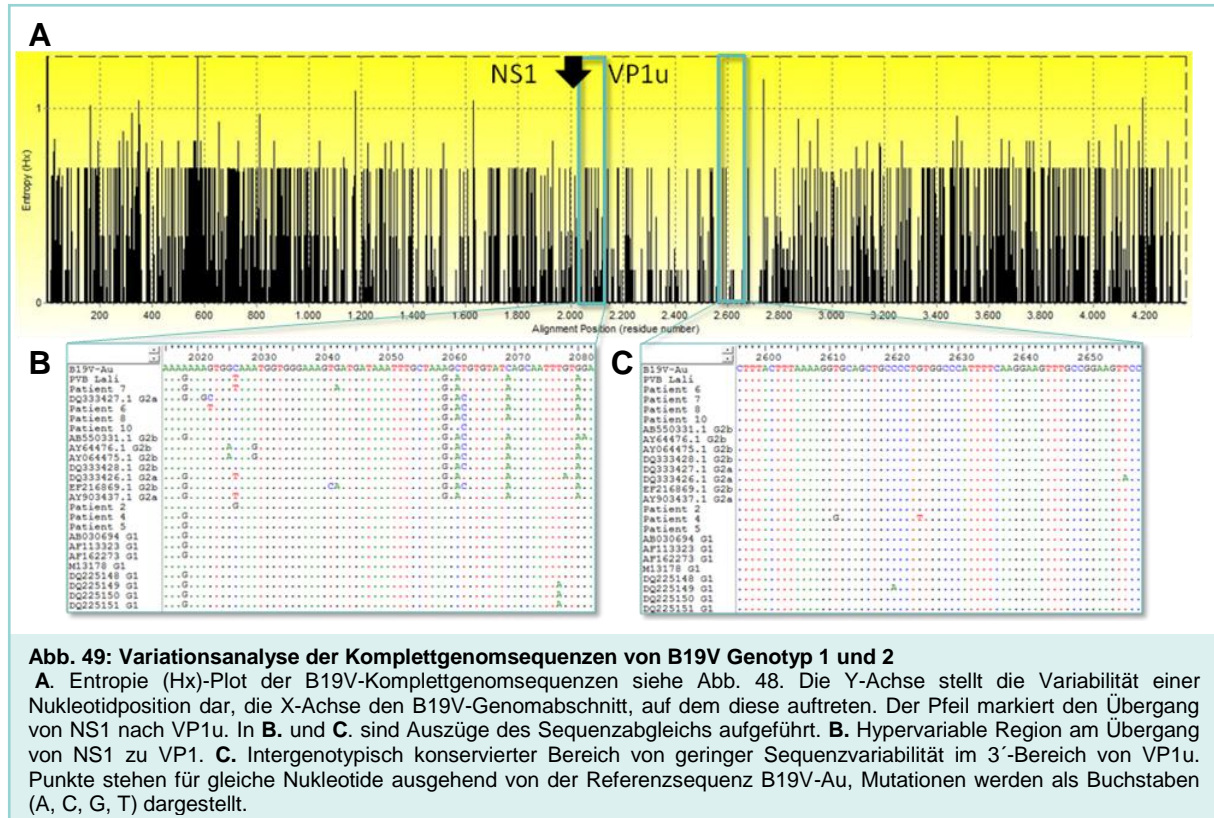
Komplettgenome der untersuchten Biopsieisolate (s. Abb. 48, „Probe“) fügten sich in die beiden intergenotypischen Cluster der veröffentlichten Sequenzen (s. Abb. 48, NCBI-Kennzeichnung) ein. Der B19V-Genotyp 2 differenziert sich in die Varianten a und b (s. Kap. 2.9.1). Die Sequenzen der Variante 2a (G2a) gruppierten sich um den Prototyp B19V-LaLi (grün, ebenfalls G2a). Abgesehen von der Sequenz „Probe 6“, die sich am Rande der G2-Gruppe befindet, bildeten auch Sequenzen der Variante 2b ein einheitliches Subcluster.



Um Polymorphismen der im oberen Teil dieses Kapitels beschriebenen B19V-Komplettgenomisolate aufzuzeigen, wurden die Abgleiche als Entropie-Plot grafisch dargestellt (s. Abb. 49). Im Entropie-Plot wird jede Nukleotidposition eines Sequenzabgleichs als unabhängig betrachtet. Die Entropie stellt in diesem Fall ein Maß für die Nukleotidvariabilität an einer bestimmten Position dar, das sowohl die Anzahl möglicher Nukleotide als auch ihre Auftretshäufigkeit berücksichtigt (Yusim et al. 2002).

3 Ergebnisse

Hierbei waren Bereiche mit unterschiedlichen Graden an Variabilität der B19V-Komplettgenomsequenzen zu beobachten. Regionen mit hoher Divergenz erschienen in den Abschnitten 500 nt - 900 nt (entspricht M13178 936 nt - 1336 nt), 1800 nt - 2100 nt (2236 nt – 2536 nt; Abb. 49B) und 3400 nt - 4300 nt (3836 nt - 4736 nt). Abschnitte in Bereichen von 1400 nt - 1700 nt (1836 nt - 2136 nt) und 2400 nt - 2750 nt (2836 nt - 3186 nt) wiesen große Sequenzhomologie auf (Abb. 49C).



Die Sequenzvariabilität wurde anhand einer Sequenzidentitätsmatrix bestimmt (s. Kap. 2.9.4). Über den kodierenden Bereich von NS1/VP1/VP2 war Genotyp 1 (G1) mit einer Nukleotiddivergenz von 1,1 % in sich konserviert und unterschied sich zu Genotyp 2 (G2) mit 10,3% (s. Tabelle 21).

Auf Aminosäureebene betrug die G1-intragenomische Abweichung < 1 %, die Abweichung von G1 zu G2 4,3%. Die Nukleotidvariabilität des gesamten kodierenden Bereichs innerhalb des Genotyps 2 betrug zwischen B19V-LaLi und der Variante 2a 1,8 % und zu Variante 2b 2,3% (Aminosäureebene: < 1 % bzw. 1,2 %; s. Kap. 2.9.1). Die Sequenzvariabilität innerhalb des B19V-Genotyps 2 war höher als die des B19V-Genotyps 1.

Eine Analyse des hochvariablen Bereichs in der B19V-Genomregion 500 nt - 900 nt (s. Abb. 49A) zeigte große intergenotypische Unterschiede, da die interne Nukleotidvarianz des Genotyps 2 zwar deutlich höher (zu LaLi: 2a: 3,3 %; 2b: 3,5 %) als die durchschnittliche Nukleotidvarianz des gesamten kodierenden Bereichs war, jedoch nicht ausreichend, um

zwei neue Subtypen zu bilden (> 5 %). Da Untersuchungen in weiteren variablen Regionen, wie dem NS1/VP1u-Bereich eine größere Nukleotidvarianz aufweisen könnten, wurde dieser Bereich daraufhin analysiert.

Tabelle 21: Inter- und intragenotypische Sequenzvarianzen (Nukleotide und Aminosäuren)

Vergleichen der Varianz von B19V Genotyp1- und -2-Sequenzen über den gesamten Kodierungsbereich (NS1-VP1/VP2) und der Genotyp 2-Sequenzen mit Varianten 2a und 2b (s. Kap. 2.9.1) der NS1/VP1u-Region. Die durchschnittlichen Prozentwerte der genetischen Distanz wurden mit der Funktion „Sequence identity matrix“ des BioEdit-Programms unter Verwendung der zwei-Parameter-Methode nach Kimura berechnet.

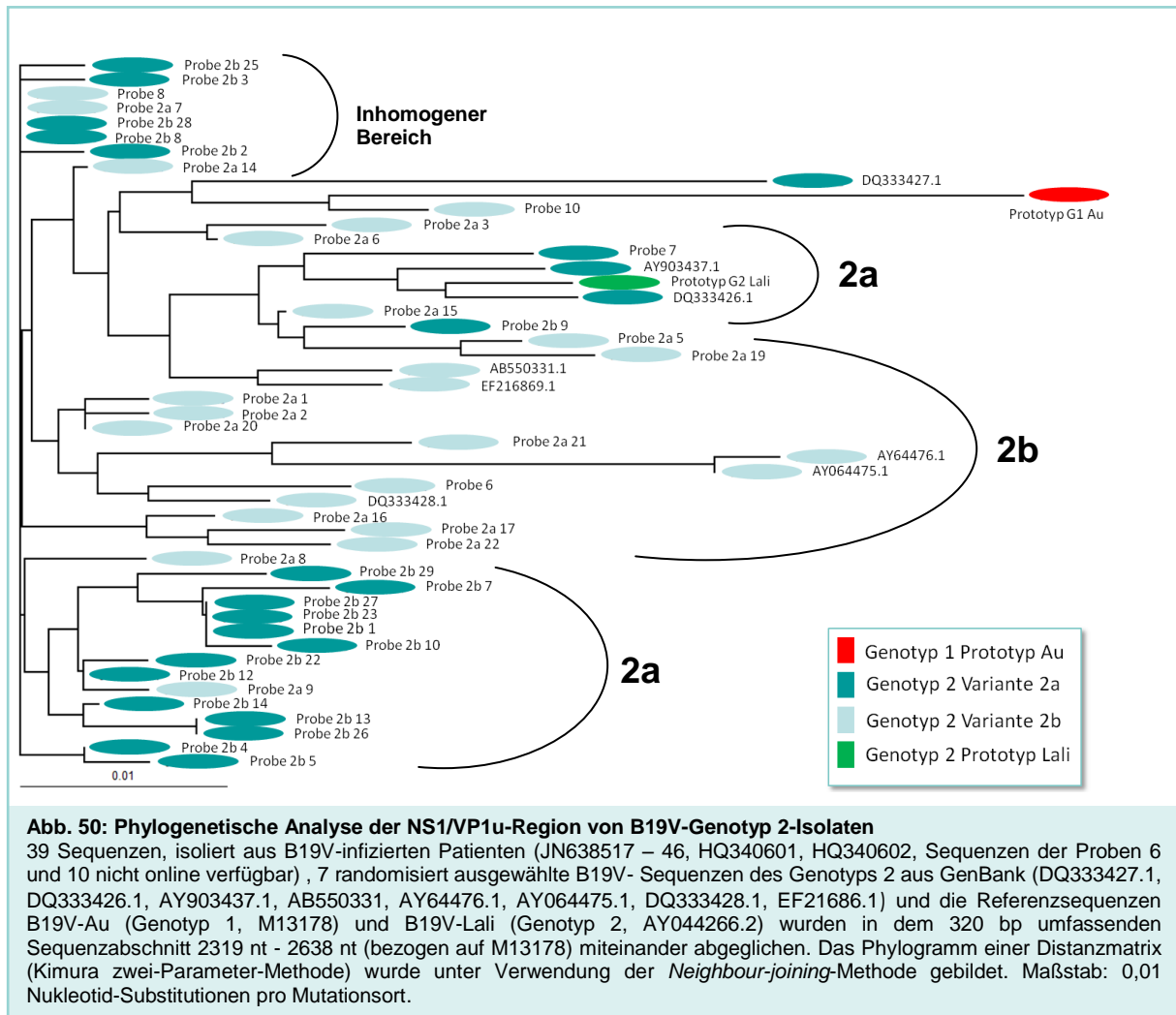
Sequenzvergleiche	Varianz [%]	
	Nukleotide	Aminosäuren
Kodierender Bereich = NS1-VP1/VP2		
B19V-Au (G1) vs. G1-Sequenzen* *s. Abb. 48	1,1	< 1
B19V-Au (G1) vs. G2-Sequenzen*	10,3	4,3
B19V-LaLi (G2) vs. G2a	1,8	< 1
B19V-LaLi (G2) vs. G2b	2,3	1,2
NS1-VP1u		
B19V-LaLi (G2) vs. G2a	3,2	2,0
B19V-LaLi (G2) vs. G2b	3,5	2,4

3.4.3 Sequenzanalysen der B19V-NS1/VP1u-Region in Genotyp 2, Varianten a und b

Der Entropie-Plot des B19V-Komplettgenoms und vorangegangene Sequenzvarianzanalysen wiesen zusammen mit früheren Berichten auf eine hypervariable Region im NS1/VP1u-Abschnitt des B19V-Genoms hin (Gallinella et al. 2003; Hemauer et al. 1996; Toan et al. 2006a). Daher wurde der NS1/VP1u-Bereich des B19V-Genotyps 2 in Hinblick auf mögliche hochvariable Sequenzen untersucht.

Die Genotyp-2-Sequenzen aus der Analyse des kodierenden Bereichs des B19V-Genoms (NS1-VP1/VP2; s. Kap. 3.4.2), zusätzlich 35 patientenspezifische B19V-Isolate des B19V-Genotyps 2 wurden in der subgenomischen NS1/VP1u-Region auf Sequenzpolymorphismen detailliert untersucht. Die phylogenetischer Analyse (s. Abb. 50) zeigte, dass sich -wie in der Analyse des Komplettgenoms- bestimmte B19V-Genotyp 2-Isolate zu Clustern gruppieren. Zwei distinkte 2a-Gruppierungen (dunkelblau) waren neben einer 2b-Gruppierung (hellblau) und einem inhomogenen Cluster zu erkennen. Einzelne Sequenzen (DQ333427.1, Proben 10, 2a 3, 2a 6, 2a 14) ließen sich keiner Gruppierung zuordnen.

3 Ergebnisse



Nukleotiddivergenzen innerhalb der B19V-Genotyp-2-Sequenzen traten an 66 Positionen des 320 bp umfassenden B19V-DNA-Abschnitts auf. 19 Mutationen führten zum Austausch einer Aminosäure, 4 davon im NS1-, 15 davon im VP1-Bereich. Die übrigen 46 Basenpaar-Substitutionen waren stille Mutationen.

Die durchschnittliche Nukleotidvariation der NS1/VP1u-Region des B19V-Genotyp 2-Prototyps (LaLi) zu Variante 2a betrug 3,2 %, zu Variante 2b 3,5 %, auf Aminosäureebene 2,0% bzw. 2,4 %. Diese Werte der NS1/VP1u-Region waren deutlich größer als die Varianz des Gesamtgenoms. Dennoch waren die Varianten a und b für die Aufteilung in zwei neue Subtypen zueinander zu homogen (<5 %). Allein die phylogenetisch solitär erscheinenden Sequenzen DQ33427.1 und Probe 10 wiesen eine Divergenz von über 5 % zu B19V-LaLi (5,4% bzw. 6,0%) und über 6 % zu B19V-Au (6,7% bzw. 6,0%) auf.

Der hochvariable NS1-VP1u-Bereich des B19V-Genoms divergiert auf Nukleotid-Ebene um maximal 3,5 % in Bezug den Genotyp 2. Für die Charakterisierung neuer genetischer B19V-Subtypen reicht diese Sequenzvarianz jedoch nicht aus.

4 Diskussion

Die Infektion mit dem humanpathogenen Parvovirus B19 (B19V) führt zu verschiedenen klinischen Manifestationen. Dies beinhaltet asymptomatische Verläufe, *Erythema infectiosum* (Ringelröteln) bei Kindern und Anämien sowie Arthralgien bei Erwachsenen und auch schwere Krankheitsbilder wie aplastische Krisen und dilatative Kardiomyopathien (Broliden et al. 2006; Bültmann et al. 2003). Neben der Infektion mit Enteroviren und Adenoviren liegt heute einer entzündlichen Herzmuskelerkrankung meist eine B19V-Infektion zugrunde. Dabei stellen myokardiale ECs, nicht aber kardiale Myozyten, die spezifischen Zielzellen für eine B19V-Infektion dar (Kandolf 2004). Die Infektion intrakardialer Endothelien kann mit kardialer Dysfunktion und der reaktiven Schädigung von Myozyten einhergehen.

Welche molekularen Mechanismen der Funktionsstörungen der myokardialen Endothelien zugrunde liegen und welche pathophysiologischen Prozesse in Gang gesetzt werden, ist bislang noch unzureichend geklärt. Bekannt ist, dass B19V Einfluss auf zelluläre Regulationsmechanismen hat und so inflammatorische Signalkaskaden, wie z.B. den JAK/STAT-Signalweg dysreguliert (Duechting et al. 2008). Auswirkungen der Infektion des Herzens mit B19V auf weitere proinflammatorische und apoptotische Signalwege wurden in der vorliegenden Arbeit näher untersucht.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden in funktionellen Zellkulturexperimenten insbesondere die molekularen Interferenzmechanismen und Interaktionen des B19V und des B19V-NS1-Proteins mit inflammatorisch wichtigen Signalkaskaden wie den MAPK- und eNOS-Signalwegen analysiert. Darüber hinaus wurden in Interaktionsstudien direkte zelluläre Bindungspartner des B19V-NS1-Proteins identifiziert, um zu zeigen, auf welche Weise B19V direkt in zelluläre Interaktionsmechanismen eingreifen kann.

Da spezifische B19V-Genommutationen Auswirkungen auf virale Prozesse wie Replikationsverhalten und folgendem Krankheitsverlauf haben können, wurden Mutationsanalysen durchgeführt und mit klinischen Charakteristika wie dem individuellen Krankheitsverlauf verglichen.

4.1 Interferenz von Parvovirus B19-NS1 mit der inflammatorischen MAPK-Signaltransduktion

Frühere Studien haben gezeigt, dass B19V durch Beeinflussung der IL-6- und JAK/STAT-Signalgebung eine Entzündungsreaktion des myokardialen Endothels auslösen kann (Duechting et al. 2008; Moffatt et al. 1996). Der MAPK-Signalweg ist, wie die JAK/STAT-Signalkaskade, mit der IL-6-Signalgebung verknüpft und könnte daher auch in die inflammatorische Signaltransduktion der Zelle modulierend eingreifen. In diesem Zusammenhang wurde in Studien von anderen Viren berichtet, dass z.B. das Hepatitis B Virus (HBV)

und das humane Immunodefizienzvirus (HIV) sowohl Signalwege induzieren als auch Effekte wie Apoptose, Dysregulation des Zellzyklus und inflammatorische Prozesse auslösen können (Arbuthnot et al. 2000; Lee et al. 2008).

Schlüsselenzyme des MAPK-Signalwegs stellen die Kinasen p44/42-ERK und p38-MAPK dar. p44/42-ERK wird durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren, Zytokinen, Mitogenen aber auch durch virale Infektionen aktiviert und wirkt anti-apoptotisch und proliferativ (Cargnello und Roux 2011). Diese Effekte sind jedoch stark abhängig von der Aktivierungsintensität und können bei gesteigerter Aktivierung von p44/42-ERK ins Gegenteil umschlagen und somit pro-apoptotisch wirken (Meloche und Pouyssegur 2007). p38-MAPK ist ein wichtiger Regulator proinflammatorischer Prozesse und wird hauptsächlich als Antwort auf Stresstimuli aktiviert. Stresstimuli können osmotischer und thermischer Schock, ionisierende Strahlung und verschiedene Zytokine wie IL-1 β , IL-6, IL-8 und TNF α sein. Die p44/42-ERK- und p38-MAPK-Signalwege können somit zu Zellzyklusinhibition und Apoptose beitragen (s. Kap. 1.6.1; Meloche und Pouyssegur 2007; Obata et al. 2000; Thornton und Rincon 2009).

4.1.1 Aktivierung des MAPK-Signalkaskade durch B19V-NS1-Expression

Die Einwirkung eines viralen Proteins auf ein oder mehrere Module der zellulären MAPK-Signalwege, wie z.B. MAPK, ERK oder JNK (s. Abb. 18), konnte bereits im Zusammenhang mit anderen Virusinfektionen wie bei Hepatitis- oder Herpesviren nachgewiesen werden. Die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade dient hauptsächlich der Sicherung der viralen Replikation oder Reaktivierung des Virus aus einer Latenzphase (Reeves et al. 2012; Traylen et al. 2011). Beispielsweise aktivieren das Simian Virus 40 (SV40) und Hepatitis C Virus (HCV) p44/42-ERK (Barber et al. 2002; Hayashi 2000), HIV aktiviert p38-MAPK, das Herpes simplex Virus Typ 1 (HSV-1) und das Eppstein-Barr-Virus aktivieren p38-MAPK und JNK (Hirasawa et al. 2003; Zachos et al. 1999) und das Simian Immunodefizienzvirus (SIV) aktiviert die drei wichtigsten MAPKinasen p44/42-ERK, p38-MAPK und JNK (Johnson et al. 2000). Durch die Infektion mit dem humanen Cytomegalie-Virus (HCMV) wird sowohl p38-MAPK als auch von p42/44-ERK aktiviert.

Um zu klären, welchen Einfluss B19V und insbesondere das virale Transkriptionsprotein NS1 auf die Modulation der MAPK-Signalkaskade hat, wurde in endothelialen Zellkultur-experimenten in einer Zeitkinetik die Regulation von p38-MAPK und p44/42-ERK auf Proteinebene untersucht. Es zeigte sich, dass p38-MAPK bis 48 h p.t. aktiviert wurde (Kap. 3.1.2, Abb. 34). Bei p44/42-ERK konnte über einen Zeitraum von 12 - 96 h eine Aktivierung nachgewiesen werden (Kap. 3.1.3, Abb. 35). Diese Befunde belegen eine massive Deregelation der MAPK-Signalkaskade.

Eine Aktivierung von p38-MAPK durch B19V-NS1 kann neben der Apoptose auch mit der Entwicklung einer Entzündungsreaktion einhergehen. Die Rekrutierung von Leukozyten zum Ort der Entzündung sowie deren Transmigration in ECs hängt mit der p38-MAPK-regulierten Integrität der endothelialen Verbindungen dahingehend zusammen, dass die p38-MAPK-Kaskade durch E-Selektin oder VEGF induziert werden kann (Borbiev et al. 2004). Dies führt zur Aktivierung des Aktin-Modulators HSP27 (*Heat shock protein*), der die Polymerisation des globulären G-Aktins zum fibrillären F-Aktin katalysiert (Borbiev et al. 2004; Rousseau et al. 1997). Diese Aktin-Reorganisation, die zur Ausbildung von Stressfasern führt, hat eine Phosphorylierung der *myosin light chain* zur Folge. Beide Effekte bewirken durch Öffnung der Zell-Zell-Kontakte (*Tight junctions*) den Verlust der endothelialen Barrierefunktion. Dieser ermöglicht es Leukozyten zu transmigrieren, durch inflammatorische Prozesse in den Endothelien angrenzenden Myozyten zu schädigen und so zur Entstehung einer endothelialen Dysfunktion (ED) beizutragen. Auch das durch B19V-NS1-Transfektion aktivierte p44/42-ERK stellt neben p38-MAPK ein wichtiges Molekül zur Regulierung der trans-endothelialen Permeabilität und Migration dar. Die aktivierte Form von p44/42-ERK kann ebenso bei der Verminderung der Integrität von interendothelialen Zellkontakten mitwirken (Tremblay et al. 2006).

Die Aktivierung der p38-MAPK durch die HCMV-Infektion ist während eines Zeitraums von 8-48 h p.i. festgestellt worden. In den vorliegenden Untersuchungen konnte nach Expression von B19V-NS1 eine ähnliche zeitliche Aktivierung der p38-MAPK beobachtet werden. Eine Phosphorylierung von p44/42-ERK erfolgte bei HCMV biphasisch: 5 - 15 min nach viraler Bindung an die Zelle und 4-8 h nach Infektion als Folge der viralen Genexpression (Johnson et al. 2000). In den vorliegenden Untersuchungen konnte ebenso ein bisphasisches Aktivierungsmuster von p44/42-ERK mit Maxima bei 24 h und 72 h nach B19V-NS1-Transfektion beobachtet werden. Möglicherweise ist die biphasische Aktivierung von p44/42-ERK auf die parvovirale Genexpression (24 h) und das Einsetzen erster apoptotischer Vorgänge (72 h) zurückzuführen.

Der genaue Aktivierungsmechanismus der beiden Kinasen p38-MAPK und p44/42-ERK durch B19V-NS1 ist bislang unbekannt. Die Inhibierung der Dephosphorylierung von p38-MAPK und p44/42-ERK könnte dabei möglicherweise für die Induktion der MAPK-Aktivierung verantwortlich sein. Dieser Prozess für die Aktivierung von p44/42-ERK wurde im Zusammenhang mit einer Inhibierung der Phosphatase PP2A-Aktivität durch das SV40 *small T-Antigen* sowie für HCMV beobachtet und führt zu einer Akkumulation von phosphoryliertem MEK1/2, einer MAPKK, und phospho-p44/42-ERK (Johnson et al. 2000; Pallas et al. 1990).

Die Aktivierung von p38-MAPK über 48 h durch die HCMV-Infektion hängt mit einer frühen Inhibition der Dephosphorylierung nach Expression viraler Proteine zusammen (Johnson et al. 2000). Sie verläuft zum frühen Zeitpunkt der Aktivierung (12 h p.i.) über eine Inhibition der

Dephosphorylierung von p38-MAPK, vergleichbar zur Aktivierung von p44/42-ERK (s.o.), zum späteren Zeitpunkt (48 - 72 h p.i.) über eine gesteigerte Aktivität der übergeordneten Kinasen MKK3/6 (*Mitogen-activated protein kinase kinase*; s. Abb. 18). In den vorliegenden Untersuchungen wurde ein Abfall der Konzentration an phosphoryliertem p38-MAPK nach 72h deutlich. Die Reduktion der Phosphorylierung von p38-MAPK ist durch die HCMV-Infektion bereits nach 24 h zu beobachten und rührt vermutlich daher, dass die Dephosphorylierung durch Phosphatasen nicht mehr inhibiert wird. Die vergleichbaren Prozesse der Modulation der MAPK-Signaltransduktion durch HCMV und B19V geben Grund zur Annahme, dass durch die Aktivierung von p38-MAPK und p44/42-ERK die virale Genexpression und Replikation gesteuert werden kann. Die verschiedenen Aktivierungsmuster der beiden Kinasen in einer HCMV-Infektion sowie der B19V-NS1-Transfektion deuten dabei darauf hin, dass p38-MAPK und p44/42-ERK eine unterschiedliche Expression viraler Gene regulieren und individuelle Aufgaben im viralen Infektionszyklus, z.B. die virale Replikation, haben können (Johnson et al. 2000).

4.1.2 Einfluss von B19V-NS1-Mutanten (NTP-Bindedomäne) auf die MAPK-Signaltransduktionen

In der Fachliteratur ist beschrieben, dass das B19V-Nichtstruktur-Protein NS1 Funktionen besitzt, die für die virale Replikation und Genexpression essentiell sind. Hierzu gehören z.B. Transaktivierungs-, ATPase-, Helikase- und Endonuklease-Aktivitäten, die mit der NTP-Bindestelle und anderen Proteindomänen von NS1 assoziiert sind (Servant-Delmas et al. 2010). Weiterhin wurde gezeigt, dass Mutationen in funktionellen Gruppen der NTP-Bindestelle (Domänen A, B, B', C; s. Kap. 1.5.1.1) die NTP-Bindfähigkeit inaktivieren und dadurch sowohl die Zytotoxizität als auch das Apoptosepotenzial des NS1-Proteins verringern können (Momoeda et al. 1994; Poole et al. 2011). Proapoptotische Mechanismen in B19V-infizierten ECs steht in engem Zusammenhang mit der Auslösung von Entzündungsreaktionen im Myokard (Kandolf 2008). Über welche Signalwege diese inflammatorischen Prozesse vermittelt werden, ist noch nicht vollständig geklärt. Da B19V-NS1 den proapoptotischen MAPK-Signalweg aktiviert (s. Kap. 4.1.1), könnte dieser Signalweg bei der Zytotoxizität von B19V-NS1 eine Rolle spielen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde durch gerichtete Mutagenese eine K334E-Punktmutation im pcDNA-NS1-Expressionsplasmid generiert und deren Einfluss auf die Regulation der MAPK-Signalgebung im Vergleich zum Wildtyp-B19V-NS1 untersucht. Nach Transfektion von pcDNA-NS1-K334E in humane ECs wurde im Vergleich zu pcDNA-NS1 Wildtyp keine Aktivierung der p38-MAPK nachgewiesen (s. Kap. 3.1.4, Abb. 36A). Im Gegensatz dazu zeigte

p44/42-ERK eine vergleichbare Regulation durch pcDNA-NS1-K334E wie durch pcDNA-NS1 (s. Kap. 3.1.4, Abb. 36B).

Aus den Ergebnissen dieser Untersuchungen kann geschlossen werden, dass die Zytotoxizität bzw. der pathophysiologische Effekt von B19V-NS1 über die Aktivierung der p38-MAPK, jedoch nicht über p44/42-ERK verläuft. Die NTP-Domäne aus B19V-NS1 konnten bereits bekannten Funktionen wie der DNA-Modifizierung zugeordnet werden. Die DNA-Schädigung kann einen möglichen Mechanismus für die Induktion von Zytotoxizität und Apoptose darstellen (Poole et al. 2006), da sie als Stimulus für die Aktivierung von p38-MAPK gilt (Lee et al. 1994). Dabei steuert die Signaldauer von p38-MAPK die Fähigkeit zur Induktion der Apoptose. Eine kurze Aktivierung kann eher anti-apoptotisch wirken, eine länger proapoptotisch (Obata et al. 2000). Die 48 h lange Aktivierung, die beobachtet wurde, trägt daher vermutlich zur Entwicklung von Apoptose bei. Apoptose als Resultat einer DNA-Schädigung geht zudem mit der Aktivierung von Caspase 9 einher und verläuft über den mitochondrialen Signalweg. Beides wurde im Rahmen einer B19V-Infektion von anderen Arbeitsgruppen beobachtet (Poole et al. 2011). Auch die transaktivierende Wirkung von B19V-NS1 wird von dem NTP-Bindemotiv beeinflusst. Wildtyp B19V-NS1 vermittelt die Transaktivierung des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p21/WAF, der zur Zellzyklusinhibition beiträgt, ein Teilschritt, der initial von apoptotischen Prozessen liegt. Die B19V-NS1-NTP-Mutante löst keine Hochregulierung von p21/WAF aus (Nakashima et al. 2004), ein Zeichen, dass auf diesem Weg pathophysiologische Vorgänge durch B19V-NS1 beeinflusst werden können.

4.1.3 Aktivierung des MAPK-Signalkaskade durch B19V-Infektion

In den vorangegangenen Experimenten wurde der Einfluss des funktionalen B19V-Proteins NS1 auf die MAPK/ERK-Signaltransduktion untersucht. In weiteren Experimenten sollte nun überprüft werden, ob die beobachteten Befunde der Aktivierung von p38-MAPK und p44/42-ERK auch für die Infektion mit B19V unter physiologischen Bedingungen im Kontext des B19V-Gesamtgenoms gültig sind. Dazu wurden UT-7/EPO-Zellen mit B19V infiziert. Die Megakaryozyten-Zelllinie UT-7/EPO stellt ein permissives Zellkultursystem dar, in dem B19V replizieren kann (Morita und Sugamura 2002). Die Ergebnisse dieser Untersuchungen zeigten eine starke, initiale Aktivierung von p44/42-ERK bis 48 h p.i. (Kap. 3.1.7, Abb. 39), wohingegen bei p38-MAPK kein Unterschied zur nicht-infizierten Kontrolle festgestellt werden konnte (Kap. 3.1.6, Abb. 38).

Die Unterschiede in der Auswirkung auf die MAPK-Signalgebung durch die B19V-Infektion in UT-7/EPO-Zellen im Vergleich zur B19V-NS1-Transfektion in hMEC-1-Zellen sind vermutlich auf unterschiedliche Genexpressions-Status der viralen Proteine NS1 und VP1/VP2

4 Diskussion

zurückzuführen. Der Überexpression von B19V-NS1 in den hMEC-1-Endothelzellen steht im Vergleich einer um den Faktor 10.000 verringerten Expression des NS1-Gens in der infizierten Megakaryoblastenzelllinie UT-7/EPO gegenüber (vgl. Abb. 33 und Abb. 37). Bei der B19V-Infektion wird zudem das Strukturprotein VP1/2 exprimiert. Wie andere Studien belegen, wird die mRNA-Expression der Gene NS1 und VP1/2 2 h - 6 h nach Infektion initiiert und steigt dann stetig an (Bonvicini et al. 2006). Auffällig ist hierbei der exponentielle Anstieg der B19V-VP1/2-Expression ab 48 h (s. Abb. 37), der parallel zur regressiven p44/42-ERK-Phosphorylierung verläuft. Das B19V-VP1/2-Protein kann durch seine PLA2-Aktivität Einfluss auf den Zellmetabolismus und die Signalgebung nehmen, beispielsweise durch die Spaltung von intrazellulären Botenstoffen wie Phosphatidylinositol (Marigiò et al. 2006), die sekundär die p44/42-ERK-Aktivität beeinflussen können.

Für eine produktive, lytische B19V-Infektion ist eine Dominanz der B19V-VP1/2-Expression im Vergleich zur B19V-NS1-Expression nötig (Liu et al. 1992). Auch der Übergang in die S-Phase des Zellzyklus ist für diesen Prozess notwendig (Bonvicini et al. 2008). p44/42-ERK ist ein Hauptregulator des Fortschritts zur S-Phase und kann je nach Länge und Stärke der Aktivierung eine Progression oder einen Arrest des Zellzyklus auslösen (Bottazzi et al. 1999; Meloche und Pouységur 2007). Eine ausgedehnte Aktivierung von p44/42-ERK führt zum vorübergehenden oder permanenten Zellzyklusarrest. Die zeitlich begrenzte Phosphorylierung von p44/42-ERK auf 48 h kann somit zur Zellzyklusprogression beitragen. Möglicherweise wird dieser Prozess durch die Akkumulation des B19V-VP1/2-Proteins reguliert, das nach etwa 48 h p44/42-ERK inaktiviert. Nach diesem Zeitpunkt beginnt die VP1/2-Expression die NS1-Expression zu übersteigen. Folglich kann durch diese Vorgänge die Zelle in die S-Phase übertreten, wodurch die Synthese der viralen DNA eingeleitet wird (Brown 2010).

B19V-NS1 kann in ECs durch Schädigung der Wirts-DNA die Aktivierung der p38-MAPK und den Zellzyklusarrest in der G₁-Phase induzieren (Morita et al. 2003; Poole et al. 2011; Thornton und Rincon 2009). Durch diesen Mechanismus wird aber vermutlich keine Phosphorylierung von p38-MAPK induziert, da die B19V-NS1-Konzentration in den permissiven UT-7/EPO-Zellen deutlich geringer ist als bei NS1-transfizierten ECs. 48 h p.i. mit dem Einsetzen der Synthesephase nimmt die NS1-Expression jedoch nochmals deutlich zu. Das resultierende NS1-Protein kann hier aber durch Funktionen in der viralen Replikation und Genexpression gebunden werden (Kivovich et al. 2012), somit bleibt hier p38-MAPK nach wie vor inaktiv.

Die in Kap. 4.1.2 aufgestellte Hypothese bezüglich der pathophysiologischen/zytotoxischen Effekte durch B19V-NS1, die über den p38-MAPK-Signalweg vermittelt werden, lassen sich auf das Modell der permissiven UT-7/EPO-Zellen übertragen. Hier ist B19V-NS1 zwar funktionell, jedoch in sehr viel geringerem Maße vorhanden als in semi-permissiven transient transfizierten ECs. Da hier der p38-MAPK-Signalweg vermutlich aufgrund der geringen

Abundanz von B19V-NS1 nicht aktiviert wird, kommt es folglich nicht zur NS1-vermittelten Apoptose und die Zelle kann -wie in der *in vivo* Situation- dem lytischen Infektionszyklus des Virus dienen (Liu et al. 1992; Morita und Sugamura 2002).

Alternativ wäre denkbar, dass in beiden Fällen B19V-NS1, jedoch auf verschiedene Arten den p38-MAPK und p44/42-ERK-Signalweg aktiviert, der von der Aktivität der NTP-Bindestelle abhängt. Wie im vorangegangenen Kap. 4.1.2 gezeigt, verläuft die Fähigkeit zur p44/42-ERK-Aktivierung unabhängig von der NTP-Bindestelle. Neu synthetisiertes B19V-NS1 kann zunächst über einen bestimmten, energetisch günstigen Aktivierungsmechanismus die Phosphorylierung von p44/42-ERK induzieren. Eine „Besetzung“ der Wirts-DNA und deren Schädigung, die die enzymatische ATPase-Aktivität der NTP-Bindestelle erfordert, sind energetisch weitaus aufwändiger (Christensen et al. 1995). Die konsekutive Aktivierung von p38-MAPK bleibt somit aus.

Im Gegensatz zu den semi-permissiven ECs, exprimieren die permissiven UT-7/EPO-Zellen nach B19V-Infektion sowohl B19V-NS1 als auch B19V-VP1/2. Die fehlende Aktivierung der p38-MAPK könnte somit auf den Expressionsunterschied dieser viralen Gene und/oder anderer Aktivierungsmechanismen dieser Signalmoleküle durch B19V-NS1 zurückzuführen sein, die in weiteren Untersuchungen zu klären sind. Es kann weiterhin gefolgert werden, dass die initiale Aktivierung von p44/42-ERK mit der Zellzyklusprogression in Verbindung steht, von der wiederum die Replikation des Virus abhängig ist. Die hier vorgestellten Untersuchungen zu Wirkmechanismen von B19V und B19V-NS1 in verschiedenen Zellarten hat dazu beigetragen, die unterschiedliche Manifestation einer B19V-Infektion ansatzweise zu verstehen.

4.1.4 Interaktion des B19V-NS1-Proteins mit dem MAPK-Signalweg

Die MAPK-Signalkaskade wurde ursprünglich als linear ablaufender Signalweg angesehen, die ein spezifisches Eingangssignal direkt an eine biologische Reaktion koppelte. Heute ist klar, dass der Übertragungsweg jedoch über ein komplexes Netzwerk aus Signalkaskaden stattfindet, die auch lateral miteinander verknüpft sein können (Schaeffer und Weber 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fragestellung bearbeitet, ob das B19V-NS1-Protein eine direkte Protein-Protein-Interaktion mit der MAPK-Signalkaskade einhergeht, oder ob es sekundär mit den MAPKs vorgeschalteten Aktivatoren agiert. Der Ansatzpunkt, an dem B19V oder B19V-NS1 mit der MAPK-Signalkaskade interagiert, ist bisher nicht geklärt. Da der MAPK-Signalweg durch eine Vielzahl von Stimulatoren aktiviert werden kann, ist nicht klar, ob die Aktivierung des MAPK-Signalwegs direkt über Phosphorylierungen einer MAPK oder indirekt über die Aktivierung eines stromauf gelegenen Faktors erfolgt. Verschiedene Hepatitisviren (B, C und E) beispielsweise greifen bei unterschiedlichen Schritten der

4 Diskussion

MAPK-Signaltransduktion ein, was wiederum unterschiedliche stromab-Effekte hervorruft und zu den verschiedenen Verlaufsformen der Infektionen beitragen kann (Panteva et al. 2003). Das virale Transaktivatorprotein HBX von HBV beispielsweise verhindert die Hydrolyse von Ras-GTP zum inaktiven Ras-GDP, was zu einer Aktivierung von Ras und dem nachgeschalteten p44/42-ERK-Signalweg führt. Zudem stimuliert HBX die Expression des EGF-Rezeptors, was wiederum ebenfalls eine Aktivierung von p44/42-ERK zur Folge hat. Eine gesteigerte Expression des EGF-Rezeptors konnte auch nach B19V-NS1-Expression nachgewiesen werden (s. Kap. 4.1.5.1 und 4.2.1.2.1). Die Aktivierung von p44/42-ERK bewirkt in der HBV-Infektion eine Deregulation des Zellzyklus der Wirtszelle und ermöglicht so die Integration der viralen DNA in das zelluläre Genom. Dies kann zu einer Chronifizierung der Hepatitis-Erkrankung führen. Auf welche Weise B19V in der chronischen Form der CMP sein Genom aufrecht erhält, ist Gegenstand aktueller Studien.

Von anderen Viren wie SIV ist bekannt, dass eine MAPK-Aktivierung schon durch die virale Bindung an der Wirtszelle ausgelöst werden kann. Um in eine Wirtszelle einzudringen, bindet SIV an die Rezeptoren CXCR4 oder CCR5. Das Virus nutzt hierbei die signalgebenden Eigenschaften von spezifischen Korezeptoren, um die MAPK-Kaskaden zu stimulieren (Popik und Pitha 1998). Bei HSV-1 dagegen erfolgt eine MAPK-Aktivierung erst nach Beginn der viralen Proteinsynthesen. Da die MAPK-Aktivierung jedoch keinen Einfluss auf die Permissivität einer HSV-1-Infektion hat, ist noch unklar, welche Aufgabe die MAPK-Aktivierung in diesem Fall erfüllt (Johnson et al. 2000). In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aktivierung der MAPK-Signalkaskade potentiell mit der Expression von B19V-NS1 zusammenhängt.

Das B19V-NS1-Protein besitzt an Position 1415 nt - 1687 nt (bezogen auf GenBank M13178) ein NTP-Bindemotiv. Das NTP-Motiv ist unter den NS-Proteinen weiterer Parvoviren und anderer viraler oder zellulärer Proteinen aus der Familie der Ras-Proteine, ATP-Synthasen, der Guanylat-Cyklasen und den G-Protein-Untereinheiten hoch konserviert (Walker et al. 1982; Momoeda et al. 1994). Ras phosphoryliert MAPKKs und stellt einen Aktivator der MAPK-Signalkaskaden dar (Alberts 2011). Möglicherweise hat B19V-NS1 durch die strukturelle Ähnlichkeit zu Ras eine vergleichbare Fähigkeit. Die Aufklärung der exakten Molekülstruktur und die Identifikation direkter zellulärer Interaktionspartner von B19V-NS1 könnten Aufschluss über diese Hypothese geben. Dieser Ansatz der direkten Interaktionspartner wurde in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die Ergebnisse werden in Kap. 4.3.1 auch unter dem Aspekt der MAPK-Aktivierung diskutiert.

Eine indirekte Aktivierung des MAPK-Signalwegs durch B19V/B19V-NS1 wäre beispielsweise über die bereits bekannte Interaktion von B19V-NS1 mit dem Ionenaustauscher NHE1 denkbar, die zur Ansäuerung des Zellmilieus führt (Lupescu et al. 2009). Als oxidativer/osmotischer Stress unterstützt dieser Effekt möglicherweise einer Induktion des

MAPK-Signalwegs. Auch die von B19V-NS1 induzierten DNA-Schäden im Genom der Wirtszelle (Kivovich et al. 2012; Poole et al. 2011) könnten zu einer zur Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs führen. Generell könnte die Aktivierung der MAPK-Kaskade einen spontanen zellulären Verteidigungsmechanismus auf das virale Eindringen darstellen, mit dem Ziel die Virusreplikation durch programmierten Zelltod zu unterbinden (Zachos et al. 1999). Einige Herpesviren wie CMV, EBV und HSV-1 benötigen jedoch p38-MAPK oder zusätzlich JNK um effizient lytisch replizieren zu können (Adamson et al. 2000). Im Gegensatz dazu wird in den permissiven UT-7/EPO-Zellen der p38-MAPK-Signalweg durch B19V nicht aktiviert, jedoch p44/42-ERK. Somit scheint B19V einen anderen Einfluss auf die MAPK-Signalwege zu haben als Herpesviren. Weitere Untersuchungen könnten zeigen, ob B19V auch Einfluss auf den JNK-Signalweg hat und dieser möglicherweise an der Replikation des Virus beteiligt ist.

4.1.5 Regulation der MAPK-Zielgene durch B19V-NS1

Zur Untersuchung der Expression der Zielgene des MAPK-Signalwegs wurden im Rahmen dieser Arbeit RT²-Profilier Array Analysen durchgeführt, mittels deren 84 wichtige Gene der MAPK-Signalkaskade untersucht wurden (s. Tabelle 22, Anhang). Eine Regulation von Zielgenen durch B19V-NS1 wurde 24 h p.i. analysiert. Beim Großteil der regulierten Gene wurde die Expression deutlich aber nicht signifikant gesteigert. Zehn Zielgene jedoch zeigten eine signifikante Aktivierung, im Einzelnen CDKN1A, CDKN2A, CKN2B, COL1A1, EGFR, MAP4K1, MAPK11, MAPK13, MEF2C und SFN (s. Kap. 3.1.8.2, Abb. 42). Als einziger Faktor, der deutlich herunter reguliert war, wurde MAP2K7 identifiziert. Die positiv-regulierten Gene steuern Mechanismen wie Zellzykluskontrolle, Antwort auf zellulären Stress und pro-inflammatorische Zytokine sowie die Signalweiterleitung, letztere beide Funktionen werden auch mit der negativ-regulierten MAP2K7 assoziiert.

4.1.5.1 Hochregulierte Zielgene des MAPK-Signalwegs nach B19V-NS1-Expression

Nach B19V-NS1-Expression einer stabilen B19V-NS1-Endothelzelllinie wurden durch MAPK-spezifische RT²-Profilier Array Analysen zehn MAPK-Zielgene identifiziert, die signifikant hochreguliert wurden: CDKN1A, CDKN2A, CKN2B, COL1A1, EGFR, MAP4K1, MAPK11, MAPK13, MEF2C und SFN (s. Kap. 3.1.8.2, Abb. 42).

Besonders bei Faktoren der Zellzykluskontrolle wurde durch die Expression von B19V-NS1 in diesen Untersuchungen eine drastische Hochregulation beobachtet. Hierzu zählten aus-

4 Diskussion

schließlich inhibierende Komponenten wie die CDKNs (*Cyclin-dependent kinase inhibitor*) 1A, 2A und 2B sowie Stratifin (SFN).

Deutlich durch die B19V-NS1-Expression reguliert waren in den vorliegenden Untersuchungen die beiden CDKNs 2A (p16) und 2B (p15), deren Expression im Vergleich zur Kontrolle 531- bzw. 281-fach gesteigert wurde. Es handelt sich hierbei um die Zellzyklusinhibitoren p16 und p15, die beide neben CDKN1A ebenfalls über die p44/42-ERK-Signalgebung aktiviert werden können (Han et al. 2005; Malumbres et al. 2000). Ein mitotischer Arrest in physiologisch gesunden Zellen ist generell mit der Hochregulierung von p53, CDKN1A und CDKN2A verbunden, obwohl das Repertoire der Cdk-Inhibitoren je nach Zelltyp und Kontext variieren kann (Meloche und Pouysségur 2007).

Das 10-fach hoch regulierte Stratifin (=14-3-3-Protein) wird über p38-MAPK und p53 aktiviert und bindet an verschiedene Signalmoleküle des Zellzyklus wie z.B. Cdc25B und Cdc2. Bei der Beteiligung an der Zellzyklusinhibition exportiert es den phosphorylierten Cdc2-Cyclin B-Komplex aus dem Nukleus und inhibiert zusätzlich Cdc25 (s. Kap. 1.6.1.2, Abb. 19; Thornton und Rincon 2009). Der Zellzyklusarrest kann zur Apoptose der Zelle führen und so den ersten Schritt auf dem Weg zu einer ED darstellen.

Die Expression von CDKN1A/p21/WAF (*Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A*) wurde in den Experimenten dieser Arbeit um den Faktor 5 gesteigert. CDKN1A bindet an und inhibiert verschiedene Cdk's und ist ein essentieller Regulator des Zellzyklusfortschritts in den G₁/S- und G₂/M-Phasen. Sowohl von anderen Viren wie HBV (Chin et al. 2008) und MVM (*Minute virus of mice*; de Op Beeck et al. 2001) als auch von B19V (Morita et al. 2003) ist beschrieben, dass diese eine CDKN1A-Induktion mit resultierendem Zellzyklusarrest verursachen können. Ebenso wurde berichtet, dass B19V-NS1 unter Mitwirkung des Transkriptionsfaktors Sp1 eine CDKN1A-Expression aktiviert (Nakashima et al. 2004). Eine Akkumulation von CDKN1A wird von p44/42-ERK und/oder p38-MAPK gesteuert. Die Wirkung ist bilateral und von der Signalstärke durch Raf-1 abhängig. Durch ein geringes Raf-1-Signal kommt es einerseits zur Zellzyklus-Progression, bei erhöhter Raf-1-Aktivität durch dauerhaftes bzw. stark aktiviertes p44/42-ERK zum Zellzyklusarrest (Meloche und Pouysségur 2007; Pumiglia und Decker 1997; Roovers und Assoian 2000). Eine Aktivierung von CDKN1A dient im Normalfall der Verzögerung der Zellzyklusprogression um die Zelle vor DNA-Schäden und Apoptose zu schützen (Deacon et al. 2003). Wie bei den vorigen Untersuchungen in ECs gezeigt werden konnte, wird die B19V-induzierte Zellzyklusinhibition offensichtlich durch eine Kombination von CDKN2A, CDKN2B und CDKN1A reguliert, die durch B19V-NS1 verstärkt exprimiert wurden. Der B19V-NS1-vermittelte Zellzyklusarrest stellt möglicherweise eine Grundvoraussetzung für Initiierung von proapoptotischen Prozessen in myokardialen ECs während einer B19V-Infektion dar, die zu einer endothelialen

Aktivierung und folgend zu einer ED führen können, wie bei der B19V-iCMP beobachtet (Tschöpe et al. 2005).

B19V benötigt für die effiziente Replikation eine proliferierende Zelle, da das Virus von der Transkriptionsmaschinerie der Zelle abhängig ist (Brown 2010). Eine Hochregulation von inhibierenden Faktoren des Zellzyklus durch B19V-NS1 in ECs wie CDKNA1, CDKN2A, CDKN2B und SFN kann jedoch einen Zellzyklusarrest induzieren, folglich kann das Virus nicht replizieren. Dieser Punkt scheint zunächst widersprüchlich, spiegelt jedoch die physiologische Situation in semi-permissiven Zellen wie ECs wider (s. Kap. 1.2.4). B19V-infizierte ECs des Herzens könnten durch die Zellzyklusinhibition in die Apoptose und schließlich in eine ED übergehen und so zur Entstehung einer iCMP beitragen. Die Vermehrung des Virus durch eine lytische Infektion dagegen findet vermutlich hauptsächlich in permissiven Zellen statt. Auf welche Weise Faktoren des Zellzyklus in diesen Zellarten reguliert werden, müssen weitere Untersuchungen in z.B. UT-7/EPO-Zellen zeigen.

Ein weiterer Faktor, der durch eine B19V-NS1-Expression hochreguliert wurde (39-fach), ist Collagen I (COL1A1). Das fibrilläre COL1A1 ist Bestandteil der extrazellulären Matrix und seine Expression Schlüsselmerkmal einer chronischen Inflammation. Die transkriptionelle Aktivierung von COL1A1 könnte durch STAT3 erfolgen, das durch B19V-NS1, wie vor kurzem beschrieben, aktiviert wird (Duechting et al. 2008), da die Promotorregion des COL1A1 mit denen der STAT3-Zielgene überlappt (Ambrosino et al. 2006). Die gesteigerte Expression von COL1A1 könnte somit zur Aufrechterhaltung einer Inflammation beitragen und mit den damit einhergehenden pathophysiologischen Prozessen in Zusammenhang stehen.

Ein weiteres durch B19V-NS1 31-fach hochreguliertes Zielgen des MAPK-Signalwegs kodiert für den Wachstumsfaktorrezeptor EGFR (*Epidermal growth factor receptor*). In diesem Zusammenhang induziert das X-Protein des HBV eine Überexpression des membranständigen Glykoproteins EGFR durch Transaktivierung des EGFR-Promotors (Panteva et al. 2003). Im Fall von HBV hat die erhöhte EGFR-Rezeptordichte auf der Zelloberfläche eine gesteigerte EGFR-Signalgebung zur Folge, die zur Aktivierung der Raf/MEK/ERK-Kaskade führt. Andere Studien zeigten, dass ein EGFR, der durch Genamplifikation in Glioblastomzellen überexprimiert wurde, zur spontanen Autophosphorylierung fähig ist, sich dadurch ohne Ligandenbindung selbst aktiviert und daraufhin eine konstitutive Phosphorylierung von ERK induzieren kann (Thomas et al. 2003). Die verlängerte ERK-Aktivierung kann über eine verstärkte p21-Expression zum reversiblen Zellzyklusarrest in ECs führen (Boucher et al. 2004; Pumiglia und Decker 1997). Die Störung des Zellzyklus ist vermutlich die Voraussetzung für Prozesse wie Zytotoxizität und Apoptose, die durch B19V ausgelöst werden und pathophysiologische Prozesse in der EC-Regulierung nach sich ziehen können.

4 Diskussion

Die Untersuchungen zur Regulation von MAPK-Zielgenen durch B19V-NS1 zeigten, dass B19V-NS1 p38-MAPK nicht nur auf Protein-Ebene beeinflussen kann, sondern auch die Expression zweier Isoformen von p38-MAPK induzierte. Bei MAPK11 (=p38 β , 3-fach) und MAPK13 (=p38 δ , 29-fach) handelt es sich um zwei der vier p38-MAPKs, die sich strukturell und funktionell sehr ähnlich sind, jedoch differenzielle Gewebe-Expressionsmuster aufweisen (Cuadrado und Nebreda 2010). Beide Isoformen werden in ECs exprimiert, davon MAPK11 besonders signifikant (Hale et al. 1999). MAPK11 ist zu 75 % sequenzhomolog zur Haupt-Isoform p38 α , zeichnet sich aber besonders durch die stärkere Aktivierung des Transkriptionsfaktors ATF2 (*Activating transcription factor 2*) aus. ATF2 reguliert mit Kofaktoren wie NF- κ B und c-Jun die Expression proinflammatorischer Proteine, wie IFN- β , E-Selektin und TGF- β 2 (Jiang et al. 1996). Eine gesteigerte Expression der MAPK11 durch B19V-NS1 könnte somit zu einer Induktion proinflammatorischer Prozesse in ECs beitragen.

Die stark hochregulierte MAPK13 kann nach Induktion durch Schäden an der Wirts-DNA die Expression des Zytokins BRAK/CXCL14 induzieren, das als sezerniertes Protein an immunregulatorischen und inflammatorischen Prozessen beteiligt ist (Ozawa et al. 2010). Es wird außerdem beschrieben, dass diese p38-MAPK-Isoform in Keratinozyten-Zellkulturen einen Komplex mit p44/42-ERK bildet und diese ERK-Kinase 24 h nach Expression inhibiert (Efimova et al. 2003). Da in ECs p44/42-ERK zu diesem Zeitpunkt nach B19V-NS1-Expression stark aktiviert war (s. Kap. 3.1.3), bewirkt MAPK13 hier vermutlich entweder andere Effekte oder interagiert in ECs nicht mit p44/42-ERK. B19V-NS1 könnte sowohl über die transkriptionelle Aktivierung der Genexpression von p38-MAPK als auch über kinetische Aktivierung des p38-MAPK-Proteins (s. Kap. 3.1.2), besonders den Isoformen β und δ , eine inflammatorische Reaktion unter Einfluss auf die Zytokinsekretion und Präsentation von Zelladhäsionsmolekülen hervorrufen und so an der Entstehung einer ED beteiligt sein.

Die MAP4K1 ist ein übergeordneter Aktivator der JNK-Signalwegs, der stromauf und stromab an Adapterproteine gekoppelt ist und so ein rezeptorvermitteltes Signal, beispielsweise durch den TNF- α - oder andere Zytokinrezeptoren, an die JNK-Phosphorylierungskaskade weiterleitet (Boomer und Tan 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte eine deutliche 4-fache Hochregulation von MAP4K1 durch B19V-NS1-Expression gezeigt werden. In verschiedenen Studien wurde im Zusammenhang mit einer B19V-Infektion eine gesteigerte TNF- α -Signalgebung beobachtet (Kerr et al. 2001; Sol et al. 1999; Tzang et al. 2008). Die erhöhte Abundanz von MAP4K1 könnte somit zu einer verstärkten Übermittlung der Zytokin-Antwort und infolgedessen zur Induktion von apoptotischen Prozessen führen.

Durch B19V-NS1 wurde weiterhin die Expression des Transkriptionsfaktor MEF2C (*Myocyte-enhancer factor 2C*) signifikant hochreguliert. Dieses Protein wird während einer Entzündungsreaktion durch p38-MAPK aktiviert und aktiviert selbst die c-Jun Transkription. p38-

MAPK beeinflusst die Immunabwehr und induziert inflammatorische Prozesse, indem die Balance von c-Jun, das während der Infektion „verbraucht“ wird, erhalten bleibt (Han et al. 1997). In ECs wird die Expression von MEF2C über proinflammatorisches VEGF stimuliert (Maiti et al. 2008). In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass B19V-NS1 die Expression von MEF2C 3-fach steigert. B19V-NS1 kann somit inflammatorische Prozesse sowohl durch Aktivierung und vermehrte Transkription von p38-MAPK, als auch durch Steigerung der Expression von c-Jun, MEF2C und VEGF-C (s. Kap. 4.2.1.2.1) beeinflussen, die so zur Entstehung einer iCMP beitragen können.

4.1.5.2 Supprimierte Zielgene des MAPK-Signalwegs nach B19V-NS1-Expression

Durch B19V-NS1 wurde in den MAPK-Signalweg-spezifischen RT²-Profiler Array Analysen die Genexpression von MAP2K7 (*Mitogen-activated protein kinase kinase 7*) als einziges deutlich herunter reguliert (-5-fach; s. Kap. 3.1.8.2, Abb. 42). Dieser Faktor ist ein Aktivator des JNK-Moduls unter den klassischen MAPKs (s. Kap. 1.6.1.2, Abb. 18). Eine aktivierte JNK kann über eine gesteigerte Expression und Transaktivierung von c-Jun durch Induktion der Expression von proapoptotischen Genen Apoptose fördern (Cargnello und Roux 2011; Dhanasekaran und Reddy 2008). Obwohl MAP2K7 als aktivierender Faktor der JNK herunter reguliert war, konnte zuvor gezeigt werden, dass B19V-NS1 zu einer Expressionssteigerung von c-Jun führt (Duechting 2008). Möglicherweise wird der JNK-Signalweg über andere Kinasen wie z.B. MAP2K4 aktiviert, dessen Expression durch B19V-NS1 nahezu unverändert blieb, und kann so apoptotische Prozesse einleiten. Eine Genauere Prüfung der Regulation der MAP2K7 müssen zukünftige Arbeiten ergeben.

4.2 Einfluss von B19V auf den eNOS-Signalweg

Eine Funktionsstörung des Endothels (endotheliale Dysfunktion) hat gravierende pathophysiologische Folgen. Die Steuerung der endotheliale NO-Synthase (eNOS) ist dabei essentiell für die Funktionalität einer EC und ist zudem, wie der MAPK-Signalweg, an der inflammatorischen Signalweiterleitung beteiligt. Eine Dysregulation des zellulären NO-Haushalts kann u.a. zu Inflammation, Hypoxie oder dem Verlust der endothelialen Barrierefunktion führen (Justice et al. 2000). Ob B19V auch einen Einfluss auf dieses Enzym und die damit verbundenen Signalkaskaden ausübt, wurde in der vorliegenden Arbeit erstmals untersucht.

Nur aktivierte ECs können auch eine inflammatorische Antwort vermitteln (Ward und Hunninghake 1998). Eine generelle Definition der EC-Aktivierung stellt die Veränderung des Phänotyps oder der Funktion der EC als Reaktion auf Umweltreize dar. Bekannte Stimuli, die

eine funktionellen Änderung in humanen ECs induzieren, sind humorale Agonisten wie Acetylcholin und Bradykinin, die mit Zelloberflächenrezeptoren interagieren, Zytokine wie VEGF und IL-6, Signalfaktoren wie Thrombin und bakterielle Endotoxine oder andere mikrobielle Produkte wie virale Proteine, hämodynamische Störungen, Oxidanzien und UV-Strahlung (Cines et al. 1998).

Um zu überprüfen, ob B19V bzw. B19V-NS1 einen Einfluss auf die eNOS-Signalkaskade hat, wurden B19V-NS1 in einer stabilen B19V-NS1-Endothelzelllinie exprimiert und daraufhin in eNOS-spezifischen Genexpressions-Arrays Zielgene des eNOS-Signalwegs analysiert. Die Untersuchungen haben gezeigt, dass als Reaktion auf die B19V-NS1-Expression in endothelialen Zellen 46 von 92 untersuchte Gene verglichen mit dem physiologischen Normalzustand der Zelle hoch oder herunter reguliert waren (s. Kap 3.2.1, Abb. 43). Laut Definition des vorangehenden Textabschnitts handelt es sich hierbei um eine Aktivierung der EC, die folgend in eine ED und/oder Inflammation übergehen kann.

4.2.1 Regulation von eNOS-Zielgenen durch B19V-NS1

Untersuchungen zur Regulation des eNOS-Signalwegs wurden in Form eines Expressionsprofils von 92 Zielgenen des eNOS-Signalwegs nach B19V-NS1-Expression in der vorliegenden Arbeit durchgeführt (s. Tabelle 23, Anhang). Eine Regulation der Zielgen-Expression durch B19V-NS1 wurde wie im MAPK-Array (s. Kap. 3.1.8.2) nach 24 h p.i. analysiert. Es zeigte sich, dass viele Faktoren, die mit eNOS assoziiert sind, zum Teil deutlich reguliert sind (s. Kap 3.2.1). Eine starke Aktivierung von Rezeptorklassen (z.B. EGFR, EDG, G-Proteingekoppelte Rezeptor, RTKs) und Faktoren der eNOS-Signaltransduktion (v.a. Adenylatcyclasen). Zytoskelettkomponenten, Faktoren der Signalweiterleitung des eNOS-Signalwegs (z.B. Akt, PIK3CD, G-Proteine) und vor allem das eNOS-inhibierende Transportprotein NOSTRIN wurden transkriptionell herunter reguliert (s. Kap. 3.2.1, Abb. 43). Bemerkenswert war, dass Faktoren, die eNOS direkt aktivieren sowie eNOS selbst im Vergleich zur Kontrolle nicht nachweisbar reguliert blieben.

Im Folgenden werden die regulierten Gene dargestellt, die im Rahmen der Fragestellung der vorliegenden Arbeit von Bedeutung sind und mit pathophysiologischen Prozessen der EC-Funktion im Zusammenhang stehen können.

4.2.1.1 Supprimierte Zielgene des eNOS-Signalwegs nach B19V-NS1-Expression

4.2.1.1.1 Zytoskelettbestandteile und eNOS-Transport

Die eNOS-Regulierung hängt von einer Anzahl an Effektoren ab, die die eNOS-Aktivierung zeitabhängig und durch räumliche Lokalisation kontrollieren. Eine wichtige Rolle beim subzellulären Transport von eNOS und den damit verbundenen Regulationsmöglichkeiten spielen Bestandteile des Zytoskeletts wie Aktin (Fleming und Busse 2003). Um die Regulation von Zielgenen des eNOS-Signalwegs zu überprüfen, wurde die Expression von eNOS-Zielgenen in hMEC-NS1-exprimierenden Zellen mit hMEC-1-Kontrollzellen verglichen.

Globuläres Aktin (ACTG2) wurde in den vorliegenden Expressionsstudien durch B19V-NS1 32-fach herunter reguliert (s. Kap 3.2.1). Das Aktin-Zytoskelett beeinflusst die eNOS-Aktivität z.B. durch Übertragung von Scherstress, einem wichtigen mechanischen Stimulus für eNOS. Es sorgt für die reversible Translokation von eNOS zwischen der Zellmembran und dem Golgi-Apparat und wirkt mit dem Arginin-Transporter CAT-1 als „Trichter“, der kontinuierlich neues Substrat (L-Arginin) zu eNOS befördert. Eine direkte Verbindung von eNOS mit ACTG2 resultiert in einer signifikant erhöhten eNOS-Aktivität (Dudzinski und Michel 2007). Wenn eNOS dagegen mit fibrillärem Aktin assoziiert ist, findet die Translokation von eNOS statt, während dessen die enzymatische Aktivität von eNOS herunter reguliert ist. Die genauen Mechanismen sind hier jedoch noch nicht vollständig geklärt. Da ACTG2 durch B19V-NS1 herunter reguliert wurde, könnte die Aktivität von eNOS und somit deren kardio- protektiver Effekt reduziert werden, was zur Entstehung einer iCMP beitragen kann.

Eng mit der eNOS-Translokation und den Aktinfilamenten sind die eNOS-Transportproteine NOSIP (*eNOS interacting protein*) und NOSTRIN (*eNOS trafficking inducer*) sowie das Motorprotein Dynamin 2 (DNM2) assoziiert. Alle drei Proteine wurden in der vorliegenden Untersuchung durch B19V-NS1-Expression herunter reguliert, davon NOSIP (-3-fach) und DNM2 (-8-fach) leicht, NOSTRIN dagegen stark (-576-fach; s. Kap 3.2.1). NOSIP fördert die Translokation von eNOS zu intrazellulären Kompartimenten, entkoppelt es von den Caveolae und inhibiert die NO-Synthese (Dedio et al. 2001). Eine ähnliche Funktion erfüllt NOSTRIN, das als entscheidender Adapter für einen multimeren Proteinkomplex fungiert, u.a. DNM2 und Aktinfilamente bindet und so die caveolare Endozytose und eNOS-Internalisierung koordiniert (Schilling et al. 2006). Dieser Vorgang sowie eine Überexpression von NOSIP und NOSTRIN führen zur Reduktion der NO-Syntheserate (Dudzinski und Michel 2007). Eine verminderte Expression von Bestandteilen, die essentiell für den eNOS-Transport ins Zellinnere sind, kann somit nach sich ziehen, dass eNOS in den Caveolae verbleibt. Möglicherweise wird dadurch die Aktivität von eNOS gesteigert. Die Expression B19V-NS1 führt zu einer Supprimierung der Expression von Proteinen, die mit der eNOS-Translokation und -Inaktivierung in Zusammenhang stehen, kann somit zu einer Steigerung der eNOS-Aktivität

dadurch zum Schutz des Endothels beitragen. Ob dieser aktivierende Effekt oder die Hemmung durch die reduzierte ACTG2-Expression überwiegen, müssen weitere Experimente zeigen.

4.2.1.1.2 Zytokine, Rezeptoren, Kanäle

Aquaporine (AQP) bilden eine Familie aus Wasserkanälen, die in verschiedenen epithelialen und endothelialen Zellen zu finden sind. Sie regulieren den Wassertransport und damit Prozesse wie Osmose und Zellmigration. Die wichtigste Rolle spielen sie in der Peritonealmembran der Niere, in der Hornhaut des Auges und der Blut-Hirn-Schranke (Verkman 2002). In Epithelzellen wurden AQP1 und 3 gemeinsam mit eNOS als Entzündungsmediatoren im Neugeborenenerythem identifiziert (Marchini et al. 2003). Über ihre Funktion in ECs und der Assoziation mit pathophysiologischen Prozessen bei der ED wurde bisher jedoch nicht berichtet. AQP1 scheint in der Lage zu sein neben Wasser, das für die EC-Regulation wichtige NO durch die Plasmamembran von ECs zu transportieren (Herrera et al. 2006; Verkman 2002). Durch die Expression von B19V-NS1 wurden die AQP1, -2 und -3 herunter reguliert (-4-fach, -181-fach, -96-fach; s. Kap 3.2.1). Da eine Dysregulation der Aquaporine neben möglichen Störungen des NO-Transports mit osmotischem Stress einher gehen kann (Pannicke et al. 2010) und dieser wiederum in Verbindung zu der Aktivierung von p44/42-ERK steht (Lee et al. 1994), wäre ein indirekter Einfluss der B19V-NS1 auf die p44/42-ERK-Signalkaskade und die damit verbunden pathophysiologischen Prozesse erklärbar.

B19V-NS1 reduzierte die Expression verschiedener Rezeptortypen. Hierzu gehört der Östrogenrezeptor ESR2 (s. Kap 3.2.1). Diese nukleäre Hormonrezeptor und Transkriptionsfaktor begleitet wichtige Funktionen für die Homöostase des kardiovaskulären Systems und induziert nach Bindung des Liganden die Expression und Aktivierung von eNOS (Deroo 2006). Die hier beobachtete 99-fache Reduktion der Expression von ESR2 durch B19V-NS1 könnte zu einer Abschwächung der Signaltransduktion und Inaktivierung von eNOS führen und dadurch die kardioprotektive Wirkung von Östrogen außer Kraft setzen.

Mitglieder der TGF- β Familie spielen Schlüsselrollen in der Regulation von Wachstum und Entwicklung. TGF- β 1 (TGFB1) insbesondere ist ein wichtiger Vermittler bei der Steuerung immunologischer Vorgänge, indem es durch Inhibierung der IL-8- und E-Selektin-Expression Leukozyten an Adhäsion und Transmigration hindert und somit eher immunsuppressiv wirkt (Pintavorn und Ballermann 1997). Zudem bindet TGFB1 an den eNOS-Promoter und steigert so die mRNA-Produktion von eNOS konzentrationsabhängig (Tai et al. 2004). In der vorliegenden Genexpressionsanalyse wurde die Expression von TGFB1 durch B19V-NS1 um den Faktor 22 herunter reguliert (s. Kap 3.2.1). Dies könnte im Folgenden zu einer Inhibierung

der Expression von eNOS sowie zur Aufhebung der Inhibierung von IL-8 und E-Selektin führen und so zur Aktivierung der ECs beitragen.

4.2.1.1.3 Intrazelluläre Signaltransduktion

Zwei Bestandteile des heterotrimeren G-Protein-Komplexes wurden in den vorliegenden Experimenten durch die Expression von B19V-NS1 herunter reguliert, die α -Untereinheit (*Guanine nucleotide binding protein alpha*, GNAI2) 5-fach und die γ -Untereinheit (GNG2) 68-fach (s. Kap 3.2.1). G-Proteine besetzen eine Schlüsselrolle zwischen Rezeptoren und *Second-Messenger-Systemen*. Die hier regulierte α -Untereinheit ist EDG (*Endothelial differentiation gene*)-Rezeptoren und Bradykinin-Rezeptoren (BDKR) nachgeschaltet und aktiviert über PLC und IP3 die Ca^{2+} -Ströme, über Ras den MAPK-Signalweg und über PI3K/Akt eNOS, auf ADCYs hat sie einen negativen Einfluss (s. Abb. 51; Dudzinski und Michel 2007). Die γ -Untereinheit tritt ausschließlich in Verbindung mit der β -Untereinheit als Dimer auf. Sie kann ebenfalls durch Aktivierung von IP3 intrazelluläre Ca^{2+} -Ausschüttung induzieren (Viard et al. 1999). Durch die Herunterregulation dieser beiden G-Untereinheiten wird möglicherweise die Übertragung externer Signale vom Rezeptor ins Zellinnere gehemmt. Insbesondere die fehlende Aktivierung der Ca^{2+} -Ausschüttung und von PI3K/Akt kann zu einer Dysregulation der eNOS-Aktivität führen.

Durch B19V-NS1 wurde die Expression von zwei wichtigen eNOS-Regulatoren reduziert (s. Kap 3.2.1). Es handelt sich hierbei um PIK3CD (*Phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide*, -6-fach) und die Serin-Threonin-Kinase Akt1 (*v-Akt murine thymoma viral oncogene homolog 1*; -4-fach). Akt1 steht unter der Kontrolle von PIK3CD und ist der bestimmende Faktor für die eNOS-Phosphorylierung an Ser¹¹⁷⁷, die für die basale Aktivierung von eNOS nach Agonisten-Stimulation notwendig ist. Zusammen mit anderen Aktivatoren wie Calm und HSP90 bildet Akt1 einen Ternärkomplex um eNOS, der die NO-Produktion ermöglicht (Dudzinski und Michel 2007). Eine Abschwächung dieses Signalwegs, wie sie durch den Einfluss von B19V-NS1 auf die Expression von PIK3CD und Akt1 ausgelöst werden könnte, führt zu reduzierter eNOS-Aktivität und begünstigt in ECs proinflammatorische und proapoptotische Prozesse, die in eine ED gipfeln können (Bitar et al. 2010).

4.2.1.2 Hochregulierte Zielgene des eNOS-Signalwegs nach B19V-NS1-Expression

4.2.1.2.1 Rezeptorklassen und Liganden

Spezifische Rezeptor-Klassen wurden in eNOS-Array-Experimenten durch B19V-NS1 maßgeblich hoch reguliert (s. Kap 3.2.1). Einige dieser Rezeptoren spielen besonders in der EC-Regulation eine wichtige Rolle und werden im Folgenden diskutiert.

Eine überaus starke Hochregulation durch die Expression von B19V-NS1, die in diesen Genexpressionsexperimenten beobachtet wurde, war bei VEGF-C zu beobachten (+1387-fach, s. Kap. 3.2.1). Dieser Wachstumsfaktor wird während Angiogenese und EC-Wachstum ausgeschüttet, beeinflusst ebenso die Durchlässigkeit von Blutgefäßen und spielt eine wichtige Rolle in der EC-Funktion sowie in vaskulären Erkrankungen (Tai et al. 2004). Die gesteigerte Expression von VEGF-C könnte über die Aktivierung des MAPK-Signalwegs (Tsai et al. 2003; Zhu et al. 2011) oder die massiv hochregulierten LPARs (s.u.) induziert werden (Lin et al. 2007a; Lin et al. 2007b), beides Effekte, die durch B19V-NS1 ausgelöst werden können. VEGF-C kann eine Aktivierung des p38-MAPK-Signalwegs verursachen, die in Zusammenhang mit Aktin-Reorganisation und Zellmigration in ECs beobachtet wurde (Rousseau et al. 1997) und in Untersuchungen dieser Arbeit durch Überexpression von B19V-NS1 in ECs gezeigt werden konnte (s. Kap. 3.1.2). Eine solche Aktivierungsschleife kann zu verstärkter MAPK-Signalgebung und den daraus resultierenden Folgen für die EC wie Zellzyklusarrest, proapoptotische und inflammatorische Prozesse führen. Es ist bekannt, dass VEGF-C zudem einen zeit- und konzentrationsabhängigen Einfluss auf die mRNA-Expression von eNOS in HUVECs (*Human umbilicord vascular endothelial cells*) hat (Tai et al. 2004). Trotz stark hochregulierter VEGF-C-Expression konnte in den vorliegenden Untersuchungen jedoch keine gesteigerte Expression von eNOS-mRNA beobachtet werden. Dies hängt vermutlich damit zusammen, dass dieser Regulationsmechanismus über den Rezeptor KDR (*Kinase insert domain receptor*) abläuft, der in diesen Untersuchungen nicht signifikant reguliert wurde (Shen et al. 1999).

In den Untersuchungen zum Einfluss von B19V-NS1 auf Zielgene des MAPK-Signalwegs (Kap. 4.1.5.1) wurde eine Hochregulation des EGFR nach B19V-NS1-Expression beobachtet, die in den vorliegenden Untersuchungen zum eNOS-Signalweg bestätigt und an Intensität sogar übertroffen (+1361-fach; s. Kap 3.2.1) werden konnte. Neben EGFR, der zur Familie der Rezeptor-Tyrosin-Kinasen gehört und auch als ERBB1 (*v-Erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 1*) bekannt ist, wurde in diesen Experimenten die 8-fach gesteigerte Expression von ERBB2 beobachtet (s. Kap 3.2.1). Drei Hauptsignalwege vermitteln die Aktivierung des EGFR: MAPK, JAK/STAT und PI3K/Akt (El-Rayes und LoRusso 2004). Wie in Kap. 4.1.5.1 bereits gezeigt sind EGFR und ERBB2 überexprimiert zur spontanen Autophosphorylierung fähig, das heißt sie können ohne Ligandenbindung

aktiv werden und sind daher beide in der Lage, den p44/42-ERK zu aktivieren (Thomas et al. 2003). Eine Aktivierung von p44/42-ERK in ECs durch B19V-NS1 wurde bereits nachgewiesen (s. Kap. 3.1.3). PI3K und Akt1, wichtige Aktivatoren von eNOS, werden dagegen nicht reguliert, was konsistent mit den Beobachtungen der vorliegenden Untersuchungen ist (s. Kap. 4.2.1.1.3). Auch STAT3 wird nicht über einen spontan aktiven Rezeptor induziert. Da nach B19V-NS1-Expression eine Aktivierung von STAT3 erfasst wurde (Duechting et al. 2008), ist dafür vermutlich ein anderer Aktivierungsmechanismus, wie z.B. die Aktivierung über die IL-6-Signalgebung oder eine direkte Interaktion, verantwortlich (Thomas et al. 2003). Die massive Überexpression von zwei Vertretern der EGFRs unter Einfluss von B19V-NS1 führt zur spontanen Aktivierung dieser Rezeptoren und des MAPK-Signalwegs, was mit dem MAPK-Signalweg assoziierte pathophysiologische Prozesse wie Apoptose zur Folge haben kann.

Fünf Mitglieder der EDG-Rezeptorfamilie, deren Liganden die niedermolekularen Lyso-phospholipide lysophosphatische Säure (LPA) und Sphingosin-1-Phosphat (S1P) darstellen, sind LPAR (*Lysophosphatic acid receptor*) 1 und 2 sowie S1PR1, -2 und -3. Ihre Expression wurde in dieser Studie durch B19V-NS1 stark erhöht (s. Kap 3.2.1). LPAR1 und -2 wurde 1661-fach bzw. 10-fach hochreguliert, S1PR1, -2 und 3 jeweils 33-fach, 147-fach und 60-fach. Die LPAR- und S1PR1-Signalgebung ist an G-Proteine gekoppelt und vermittelt eine große Zahl an zellulären Prozessen (s. Abb. 51). Besonders herausragend sind Proliferation, Umbau des Zytoskeletts, die Aktivierung von MAPKs, Chemotaxis, Ca^{2+} -Mobilisierung und Antiapoptose (Anliker und Chun 2004; Contos et al. 2000). Dabei stehen die Rezeptoren unter anderem in Verbindung mit den Signalkaskaden um Rho, PLC, MAPK und PI3K.

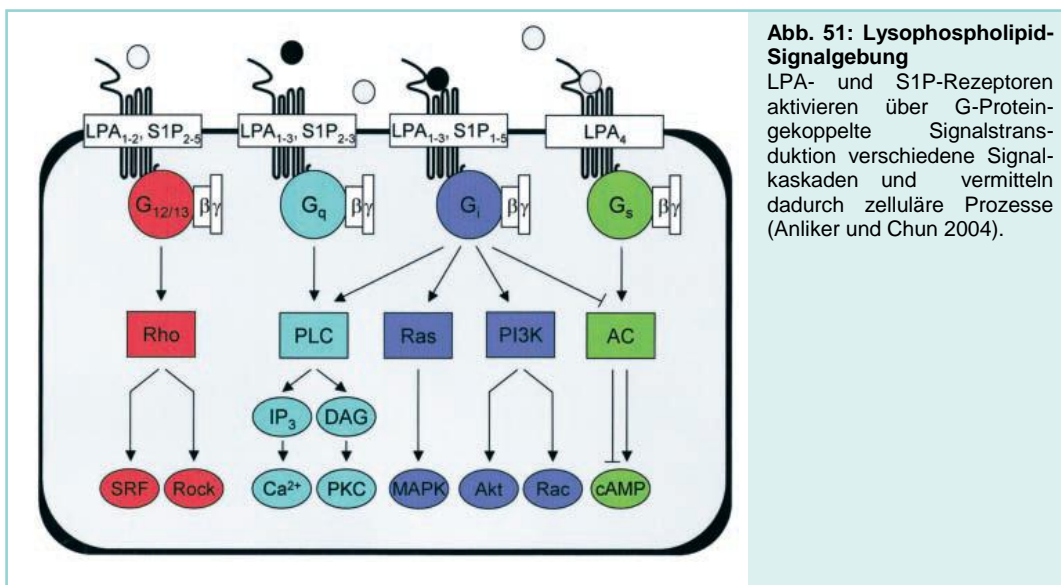


Abb. 51: Lysophospholipid-Signalgebung

LPA- und S1P-Rezeptoren aktivieren über G-Proteingekoppelte Signaltransduktion verschiedene Signalkaskaden und vermitteln dadurch zelluläre Prozesse (Anliker und Chun 2004).

Die Dysregulation der LPAR-assoziierten Signalwege in ECs führt zu verschiedenen pathophysiologischen Prozessen. LPAR1 trägt in dieser Zellart zur Vermittlung von Anoikis bei, einer Apoptose-Variante, die durch das Ablösen der Zellen aufgrund von Zellverankerungs-Interferenzen verursacht wird (Funke et al. 2012). Ebenso kann S1PR2, dessen Signalgebung primär über den $G_{12/13}$ -Signalweg und die Rho-GTPase abläuft (s. Abb. 51), in ECs zum Aufbrechen Cadherin-bezogenen Adhäsionsverbindungen führen (Skoura und Hla 2009). Die beiden durch B19V-NS1 deutlich induzierten Rezeptoren LPAR1 und S1PR2 können auf diese Weise zur Verminderung der EC-Integrität, zur erhöhten parazellulären Permeabilität und folglich zur Aufhebung der endothelialen Barrierefunktion führen, die einer ED voraus gehen.

Weiterhin wird durch eine Hochregulation von LPAR1 sowie S1PR1 und -3 in humanen ECs die mRNA-Expression von Genen der inflammatorischen Antwort aktiviert. Dazu gehören VEGF-C, ICAM-1, IL-1b, IL-8 und MCP (Lin et al. 2007a; Lin et al. 2007b). Diese Vorgänge führen zur verstärkten Chemotaxis und darauf folgender Monozyten-Adhäsion. Zusätzlich werden EGFR und NF- κ B aktiviert, die diese Effekte unterstützen (Lin et al. 2008). Des Weiteren kann die Aktivierung der p38-MAPK- und JNK-Signalkaskade durch alle Rezeptor-subtypen erfolgen, die in den vorliegenden Untersuchungen hochregulierten wurden (vgl. Abb. 51) und zellulären Stress, proinflammatorische Zytokinproduktion und Apoptose zu induzieren (Skoura und Hla 2009). Eine Aktivierung von p38-MAPK in ECs durch B19V-NS1 konnte bereits gezeigt werden (s. Kap. 3.1.2).

Die eNOS-Aktivität könnte durch die Überexpression der Lysophospholipid-Rezeptoren vermutlich indirekt beeinflusst werden, indem eine verstärkte Signalgebung über G_q und G_i und die konsekutive Steigerung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und Akt-Induktion stattfindet. Eine Steigerung der Ca^{2+} -Konzentration durch B19V konnte schon in einer früheren Studie nachgewiesen werden (Lupescu et al. 2006). Die Expression von B19V-NS1 kann über die Hochregulation von LPARs und S1PRs zu Prozessen beitragen, die zur Inflammation, Apoptose und Verlust der Barrierefunktion in ECs führt.

Durch die Expression des B19V-NS1-Proteins wurde die Genexpression des Rezeptor-Tyrosin-Kinase FLT1 (*Fms-related tyrosine kinase 1*) 149-fach erhöht (s. Kap. 3.2.1). VEGF-A und -B sowie PGF (*Placental growth factor*) stellen Liganden für diesen Rezeptor dar, der in ECs, Trophoblasten, Myozyten und Makrophagen exprimiert wird und mit inflammatorischen Erkrankungen, Angio- und Vaskulogenese assoziiert ist (Shibuya 2006). Ein phosphorylierter Rezeptor aktiviert den PKC-Signalweg und führt so zu einer Aktivierung des MAPK-Signalwegs. PI3K und Akt werden ebenso stimuliert und können so wiederum eNOS aktivieren. PI3K und Akt wurden in den Untersuchungen dieser Arbeit jedoch herunter reguliert. Eine eNOS-Aktivierung ist somit unwahrscheinlich. B19V-NS1 scheint einen regulato-

rischen Einfluss auf die VEGF-Signalgebung zu haben, welche mit inflammatorischen Prozessen assoziiert ist.

Die lösliche Isoform von FLT1 (sFLT1) ist ein wichtiger Modulator für die Gefäßbildung der Plazenta. Es wurden bereits Zusammenhänge zwischen einer vergrößerten Plazenta, einer B19V-Infektion und hohen Konzentrationen an sFLT1 beobachtet, die mit einer Schädigungen des Fötus durch *Hydrops fetalis* und fötaler Anämie sowie maternaler Präeklampsie, einer hypertensiven Erkrankung in der Schwangerschaft, einhergingen (Stepan und Faber 2006). Komplikationen während der Schwangerschaft infolge einer B19V-Infektion könnten somit auch durch den Einfluss von B19V-NS1 auf die deutlich gesteigerte FLT1-Expression induziert werden.

Der Bradykinin-Rezeptor BDKRB2 wurde in dieser Studie durch B19V-NS1-Expression um den Faktor 103 hochreguliert (s. Kap. 3.2.1). Die Aktivierung dieses Rezeptors in ECs initiiert eine Reihe von zellulären Antworten, die durch verschiedene Signalwege vermittelt werden. Dazu gehören die Stimulierung der MAPK-Signalkaskade sowie die Aktivierung von eNOS durch Vermittlung eines konsekutiven Ca^{2+} -Einstroms, der Phosphorylierung von eNOS an Ser¹¹⁷⁷ sowie der Dephosphorylierung an Thr⁴⁹⁵ (Bernier et al. 2000; Fleming und Busse 2003). Die durch B19V-NS1 erhöhte Expression an BDKR2 kann inflammatorische Prozesse initiieren, da dieser Rezeptor am Anfang verschiedener inflammatorischer Signalkaskaden steht.

In den vorangehenden Genexpressionsexperimenten zu eNOS-Zielgenen wurden insbesondere Rezeptoren durch B19V-NS1 signifikant hochreguliert. Die beobachtete erhöhte Rezeptordichte an der Zelloberfläche kann die Empfindlichkeit der Zelle gegenüber Liganden und Entzündungsmediatoren wie IL-6, TGF- β , VEGF, Bradykinin verstärken oder zur Autoaktivierung der Rezeptoren führen (Thomas et al. 2003) und so Einfluss auf die EC-Funktion ausüben. Viele der durch B19V-NS1 hochregulierten Rezeptortypen wie ERBB-, S1P- und LPA-Rezeptoren, sind zudem nicht nur mit der eNOS- sondern auch mit der MAPK-Signalgebung assoziiert. Da der p44/42-ERK-Signalweg vor allem über rezeptorvermittelte Signalgebung aktiviert wird, p38-MAPK vorwiegend über zellulären Stress wie DNA-Schäden, kann die erhöhte Rezeptordichte zur verstärkten Signalweiterleitung im ERK-Signalweg führen, während p38-MAPK vermutlich über B19V-NS1-induzierte DNA-Schädigungen induziert wird.

4.2.1.2.2 Intrazelluläre Signaltransduktion und *Second messenger*

Adenylatzyklen (ADCYs) sind membrangebundene Enzyme, die die Rezeptorsignalgebung über die G_s-Protein α -Untereinheit durch die Katalyse des *second messengers* cAMP

aus ATP vermitteln und so zur Signaltransduktion über die cAMP-abhängige Proteinkinase (PKA) beitragen. In den Untersuchungen zu dieser Arbeit wurden durch die Expression von B19V-NS1 die ADCYs1, -5 und -6 stark hochreguliert (jeweils 4394-fach, 57-fach, 40-fach; s. Kap 3.2.1). ADCY1 interagiert mit PKA, wird durch Ca^{2+} stimuliert und hauptsächlich im Gehirn exprimiert (Masada et al. 2009). Informationen über Funktionen von ADCY1 in B19V-B19V-relevanten Zelltypen sind jedoch bis zum jetzigen Zeitpunkt unzureichend vorhanden. ADCY5 und -6 sind kardiospezifische Isoformen, die im Herzen antagonistische Effekte bewirken (Ho et al. 2010). Überexprimiertes ADCY6 wirkt protektiv und reduziert die EC-Permeabilität (Bundey und Insel 2006), eine Überexpression von ADCY5 in Kardiomyozyten dagegen veranlasst eine verstärkte Phosphorylierung von p44/42-ERK (Wang et al. 2011) und führt zu kardialen Stress. Beide Formen können in der Zelle in sogenannten „lipid raft“ Mikrokompartmenten zusammen mit multiplen Signalkomponenten wie eNOS, β -adrenergen Rezeptoren und Caveolin kolokalisiert sein und so eine räumliche Regulationseinheit für die ADCYs-Aktivität darstellen (Ostrom et al. 2004). Welchen endgültigen Effekt die Überexpression beider Isoformen durch B19V-NS1 bewirkt und ob diese Regulation Einfluss auf eNOS hat, bleibt jedoch in weiteren Untersuchungen zu klären.

Faktoren, die vor allem den intrazellulären Ca^{2+} -Haushalt beeinflussen, sind die Phospholipase C gamma 2 (PLCG2) und der intrazelluläre Inositoltriphosphat-Rezeptor (ITPR). PLCG2 wird beispielsweise durch EGFRs aktiviert und katalysiert die Umwandlung von PIP2 zu DAG und IP3 (Inositoltriphosphat). IP3 bindet an ITPR und bewirkt eine Ausschüttung von Ca^{2+} aus dem endoplasmatischen Retikulum (Dudzinski et al. 2006). Obwohl Ca^{2+} ein essentieller Faktor für Calm, einem Aktivator von eNOS, ist, bewirkt intrazellulär erhöhtes Ca^{2+} eine Translokation und nicht eine Aktivierung von eNOS (Pott et al. 2006). Sowohl PLCG2 als auch die Isoform 3 eines ITPR wurden nach B19V-NS1-Expression 698-fach bzw. 145-fach hochreguliert (s. Kap 3.2.1). Die erhöhte Abundanz dieser beiden Komponenten kann so zu einer gesteigerten Ca^{2+} -Konzentration führen, wie sie auch durch parvovirale VP1/2-Proteine ausgelöst wird (Lupescu et al. 2006). Die intrazelluläre Ca^{2+} -Aktivität stellt einen Schlüsselregulator in der Zellfunktion dar und ist an Mechanismen beteiligt, die zu ED führen können.

Caveolae sind vesikuläre Organellen und kommen besonders häufig in Zellen des kardiovaskulären Systems wie ECs, glatte Muskelzellen, Makrophagen und kardialen Myozyten vor. Sie spielen eine wichtige Rolle im Proteintransport und der Signaltransduktion und werden durch die Membrandomänen von Caveolin1 (CAV1) gebildet und aufrecht erhalten. Eine 27-fache Hochregulierung durch B19V-NS1 konnte für das Gerüstprotein CAV1 beobachtet werden (s. Kap 3.2.1), das sowohl bei der Kompartimentierung als auch der Signalregulierung beteiligt ist (Williams und Lisanti 2004). CAV1 interagiert mit p44/42-ERK und eNOS und hält beide Faktoren in einer inaktiven Konformation. Eine Interaktion von

CAV1 mit EGFR (Wang et al. 2012) sowie die Überproduktion dieses Rezeptors (s. Kap. 3.1.8.2 und 3.2.1, Abb. 42 und Abb. 43), wie sie durch B19V-NS1 induziert wurde, können dennoch zur Aktivierung von p44/42-ERK führen (s. Kap. 3.1.3). Im Falle von eNOS geht CAV1 eine stabile Protein-Protein-Interaktion mit eNOS ein und inhibiert dessen Aktivität sowohl durch Unterdrückung stimulatorischer Signale als auch durch sterische Hinderung der Calm-Bindestelle (Michel et al. 1997). Generell ist eine Dysregulation von CAV1 mit vielen humanen pathophysiologischen Zuständen verbunden, besonders mit denen des kardiovaskulären Systems und ergeben Krankheitsbilder wie Kardiomyopathien, Atherosklerose und kardiale Hypertrophie (Williams und Lisanti 2004). B19V-NS1 kann durch den Einfluss auf CAV1 zur Entstehung solcher Phänotypen beitragen.

Zusammenfassend weisen diese Untersuchungen der Genexpression von eNOS-assoziierten Zielgenen eindeutig auf eine durch B19V-NS1 induzierte starke Dysregulation der eNOS-Signalkaskade hin. Eine direkte Modulation der eNOS-Expression durch B19V-NS1 konnte nicht beobachtet werden. Der Einfluss von B19V-NS1 auf das kinetische Aktivitätsmuster von eNOS und die damit verbundene differenzielle NO-Produktion muss in weiteren Analysen untersucht werden, um eine detaillierte Aussage über mögliche pathophysiologische Effekte machen zu können.

4.3 Interaktion zwischen Parvovirus B19-NS1 und zellulären Proteinen

Um die Effekte eines Virus auf seinen Wirt und die damit verbundenen pathophysiologischen Veränderungen verstehen zu können, ist es wichtig, zelluläre Virus-Wirt-Interaktionen zu identifizieren und einzuordnen, um anschließend z.B. effektive therapeutische Gegenmaßnahmen oder innovative diagnostische Optionen ergreifen zu können (Munday et al. 2012). Methoden der quantitativen Proteomik können dazu verwendet werden, diese Fragestellung zu bearbeiten. Dementsprechend wurde in dieser Arbeit eine Studie zur Identifizierung direkter Interaktion zwischen dem viralen Effektorprotein B19V-NS1 und zellulären Proteinen in Kooperation mit Dr. Elke Hammer (Universitätsmedizin Greifswald) durchgeführt.

Virale Proteine können Interaktionen mit Wirtszell-Proteinen ausbilden, entweder um virale Prozesse wie z.B. die Replikation in Gang zu setzen oder um zelluläre Signalwege zu stören, die z.B. die Immunantwort initiieren. Beispiele solcher multifunktionaler viraler Proteine sind das HCV-Protein NS5A (Macdonald und Harris 2004) und funktionellen HSV-1-Proteine (Santamaría et al. 2012). Die Teile des zellulären Proteoms, die mit viralen Proteinen interagieren, das sogenannte „Interaktom“, können einen tiefen Einblick in den viralen Lebenszyklus geben. Zelluläre Komponenten können analysiert werden, die wichtig für die virale Replikation sind, die eine Rolle beim Unterlaufen des Immunsystems spielen

oder durch das Virus direkt beeinflusst werden (Munday et al. 2012) und so zelluläre Prozesse wie Zellzyklusstörungen, Inflammation oder Apoptose auszulösen. Die Kenntnis der Interaktionspartner kann zudem Aufschluss darüber geben, welche viralen Effekte durch direkte Interferenzen mit zellulären Proteinen ausgelöst werden und welche dem indirekten Einfluss des Virus auf das zelluläre Proteom zuzuschreiben sind.

4.3.1 Identifikation direkter Interaktionspartner des B19V-NS1-Proteins

Um zelluläre Proteine zu identifizieren, die direkt mit dem funktionellen B19V-NS1-Protein interagieren, wurde das B19V-NS1-Protein mit einem N-terminalen *FLAG-Tag* fusioniert und in humanen Endothelzellen (hMEC-1) stabil exprimiert (s. Kap. 2.8.5). Nach Anwendung der SILAC-Methode (s. Kap. 2.8.11) und Ko-Immunpräzipitation wurden durch anschließende massenspektrometrische Messungen elf zelluläre Proteine als direkte Interaktionspartner für B19V-NS1 detektiert: ANKFY1, CAMPSAP3, E2F, FXR2, GIGYF2, GTF2, LIG3, PFKFB2, PSMD12, PTGR1 und RPA1 (s. Kap. 3.3.4.1, Tabelle 20). Diese Proteine ließen sich der Protein- und DNA-Prozessierung, der Transkriptionskontrolle, inflammatorischen Prozessen, Zell-Zell-Kontaktfunktionen und dem Energiestoffwechsel zuordnen.

4.3.1.1 B19V-NS1-Assoziation mit Faktoren der Proteinprozessierung

Das *Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein 1 (ANKFY1)* ist ein zytoplasmatisches Doppelzinkfinger-Protein, das in der Zelle am Vesikel- und Proteintransport beteiligt ist (Behrends et al. 2010). Möglicherweise sorgt es für die intrazelluläre Verteilung von neu synthetisiertem B19V-NS1-Protein.

Ein weiterer Interaktionspartner von B19V-NS1 ist eine Untereinheit des multikatalytischen Proteinase-Komplexes, des 26S-Proteasoms (s. Kap. 3.3.4.1). Hierbei handelt es sich um *26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12 (PSMD12)*, das bei lysosomalen Signalwegen eine Rolle spielt und als integraler Bestandteil des 26S-Proteasoms bei der ATP- und ubiquitinabhängigen Peptidspaltung mitwirkt (Hilt und Wolf 2004). Von anderen Parvoviren ist bekannt, dass das Proteasom eine wichtige Rolle im viralen Infektionszyklus spielt. Das *Minute virus of mice (MVM)* und das canine Parvovirus beispielsweise benötigen ein funktionelles Proteasom für die nukleäre Translokation (Ros und Kempf 2004). In anderen Viren haben Interaktionen mit dem Proteasom verschiedene Effekte. Bei HIV interagiert das Tat-Protein mit Bestandteilen des Proteasoms und inhibiert dadurch proteolytische Prozessen (Apcher et al. 2003) und HBV verbessert durch Inhibierung der Proteasom-Aktivität mit Hilfe des X-Proteins seine Replikationsrate (Zhang et al. 2004). Wegen der ähnlichen Infektionszyklen innerhalb der Parvovirus-Familie wäre eine Interaktion

von B19V-NS1 mit dem Proteasom zum Zwecke des Transports in den Zellkern zu favorisieren.

Ein weiteres identifiziertes Protein, das mit B19V-NS1 eine direkte Bindung eingeht, ist das *Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2* (FXR2; s. Kap. 3.3.4.1), ein mRNA-bindendes Protein. Es ist mit polyribosomalen Komplexen und vor allem der 60s-Untereinheit des Ribosoms assoziiert und hat Funktionen bei der Translation und der mRNA-Stabilität (Siomi et al. 1996). Durch ein nukleoläres Zielsignal und eine NLS ist es befähigt, sich zwischen Zytoplasma und Nukleolus zu bewegen und mRNA sowie virale RNA Exportin 1-abhängig aus dem Zellkern transportieren (Tamanini et al. 2000). Die Bindung von B19V-NS1 an FXR2 kann dazu führen, dass B19V-NS1 in den Zellkern transportiert wird und dort transkriptionelle Prozesse aktiviert oder Einfluss auf die mRNA-Stabilität und Proteintranslation am Ribosom hat.

4.3.1.2 B19V-NS1-Assoziation mit Proteinen der DNA-Prozessierung

Das *Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit* (RPA1), das als Interaktionspartner von B19V-NS1 in den Bindungsstudien identifiziert wurde (s. Kap. 3.3.4.1), hat wichtige Funktionen in Bereichen der zellulären DNA-Metabolisierung. RPA1 stabilisiert ssDNA und moduliert durch Bindung die Funktion einer Vielzahl von Proteinen, die Teil von Prozessen wie DNA-Replikation, Rekombination, DNA-Schädigungs-Kontrollmechanismen und DNA-Reparatur sind (Zou et al. 2006).

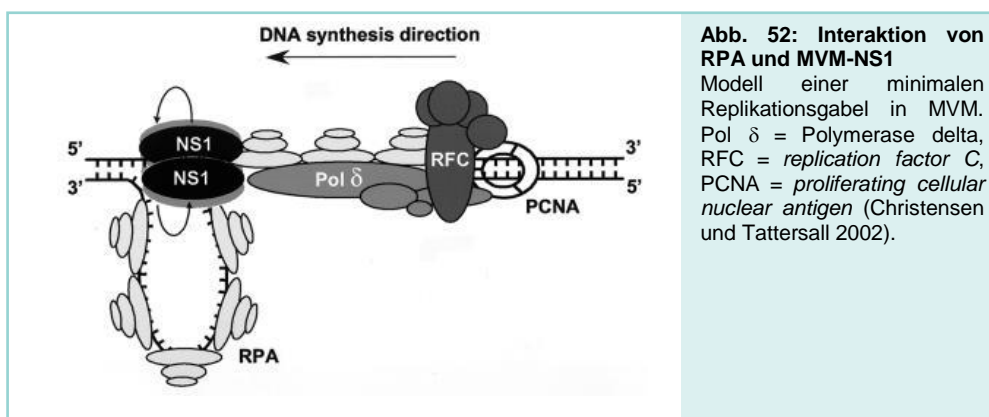


Abb. 52: Interaktion von RPA und MVM-NS1
Modell einer minimalen Replikationsgabel in MVM. Pol δ = Polymerase delta, RFC = replication factor C, PCNA = proliferating cellular nuclear antigen (Christensen und Tattersall 2002).

Eine Studie mittels MVM zeigte, dass MVM-NS1 direkt an RPA1 gebunden sein kann (Christensen und Tattersall 2002) und vermutlich eine Rolle in der parvoviralen Replikation spielt. MVM-NS1 fungiert dabei als Nickase und Helikase und trägt mit RPA1 zur Bildung der Replikationsgabel bei (s. Abb. 52). Die Interaktion von B19V-NS1 mit RPA1 könnte Funktionen beider Proteine modulieren wie z.B. die Stimulation der NS1-Aktivität durch

RPA1 und die Koordination der Entwindung und Stabilisation der DNA-Matrizes während der Replikation.

Ein weiterer detektierter Interaktionspartner von B19V-NS1 ist die DNA-Ligase 3 (LIG3; s. Kap. 3.3.4.1). Dieses Mitglied der DNA-Ligase-Familie katalysiert die Zusammenführung von DNA-Enden und ist beteiligt an der Erkennung von Einzelstrangbrüchen und deren Reparatur (Cotner-Gohara et al. 2008). B19V-NS1 kann durch kovalente Bindung an DNA Einzelstrangbrüche verursachen (Poole et al. 2011) und ist so möglicherweise mit Bestandteilen des DNA-Reparatursystems, zu denen RPA1 und LIG3 gehören, assoziiert.

Die direkte Verbindung von B19V-NS1 mit RPA1 könnte eine wichtige Rolle in der parvoviralen Replikation spielen und durch Interaktion mit Teilen des zellulären Reparatursystems zur Vermittlung stressinduzierter Signalwege wie ATM/ATR und p38-MAPK beitragen.

4.3.1.3 B19V-NS1-Assoziation mit Transkriptionsfaktoren

Der *General transcription factor II-1* (GTF2I) wurde in den Bindungsstudien als Interaktionspartner von B19V-NS1 identifiziert (s. Kap. 3.3.4.1). Obwohl die Peptid-Ratio niedrig für eine spezifische Interaktion erschien (0,83), sind große Mengen des Proteins (PSMs = 203) in der massenspektrometrischen Messung aufgetreten. Da eine hohe Abundanz des Proteins für eine spezifische Anreicherung spricht, wurde GTF2I zur Auswertung hinzugezogen.

Es handelt sich hierbei um ein multifunktionales Phosphoprotein mit vielfältigen Rollen in der Transkription, Signaltransduktion und Zellzyklus-Kontrolle (Ashworth u. Roy 2009; Cheriya und Roy 2000;). Ein aktivierter GTF2I kann verschiedene Promotoren aktivieren, unter anderem den VEGF-Rezeptor-Promotor (VEGFR; Jackson et al. 2005). Die Interaktion von B19V-NS1 könnte hier zu einer Aktivierung von GTF2I führen, die wiederum eine verstärkte Transkription von VEGFR zur Folge hat. Durch die in Kap. 4.2.1.2.1 beobachtete Hochregulation von VEGF-C, ein Ligand des VEGFR, kann es zu einer gesteigerten pro-inflammatorischen VEGF-Signalgebung kommen, die eine Aktivierung der p38-MAPK zur Folge haben kann (Tsai et al. 2003), welche im Rahmen dieser Arbeit ebenfalls gezeigt werden konnte (s. Kap. 3.1.2). Diese Korrelation deutet auf eine aktivierende Wirkung von B19V-NS1 auf GTF2I hin.

Der Transkriptionsfaktor E2F7 (E2F7) gehört zu einer Familie von Transkriptionsfaktoren, die eine wichtige Rolle in der Regulation der Zellzyklusprogression spielen (Di Stefano et al. 2003; Westendorp et al. 2012). Eine Studie von Wan und Kollegen (Wan et al. 2010) konnte den Einfluss von B19V auf die spezifischen Varianten E2F1-F2F8 der E2F-Mitglieder und dessen konsekutive Wirkung auf die Inhibierung des Zellzyklus in CD36⁺ erythroiden Progenitorzellen charakterisieren. In frühen Stadien der Infektion induzierte B19V-NS1 mit

Aktivierung der repressiven Formen E2F4 und E2F5 einen stabilen G₂-Arrest. Die folgend auftretende Induktion von G₂-assoziierten Transkriptionsfaktoren und/oder DNA-Reparatur-Proteinen verstärkte die virale Transkription und DNA-Replikation. Mit dem Fortschritt der B19V-Infektion aktivierten Prozesse der viralen Replikation die p53-Signaltransduktion, wodurch E2F7 und E2F8 im Zusammenhang mit zellulären Reaktionen auf die Schädigung der Wirts-DNA die Zellzyklusprogression blockierten. In den vorliegenden Daten konnte eine direkte Interaktion von B19V-NS1 zu E2F7 in ECs nachgewiesen werden. Auch in ECs könnte die Wechselwirkung von B19V-NS1 mit dem Transkriptionsfaktor E2F7 zur Etablierung eines Zellzyklusarrests beitragen.

B19V-NS1 kann durch die Interaktion mit den Transkriptionsfaktoren GTF2I und E2F7 in verschiedene zelluläre Prozesse eingreifen. Hierzu zählen Interaktionen mit pro-inflammatorischen Signalwegen wie MAPK und VEGF sowie mit der Zellzykluskontrolle.

4.3.1.4 B19V-NS1-Assoziation mit Bestandteilen inflammatorischer Prozesse

Ein weiteres Protein, das als direkter Interaktionspartner von B19V-NS1 identifiziert wurde, ist *PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2* (GIGYF2; s. Kap. 3.3.4.1), das wiederum mit dem Rezeptoradapter Grb10 interagiert (Giovannone et al. 2003). Beide Faktoren sind gemeinsam an der Rezeptor-Tyrosinkinase-Signalgebung beteiligt und aktivieren in Fibroblasten nach Bindung verschiedener Liganden die p38-MAPK- und p44/42-ERK-Signalwege (Deng et al. 2008). Eine Interaktion von B19V-NS1 mit GIGYF2 in ECs könnte über Grb10 zur bereits beobachteten Aktivierung der beiden Signalkaskaden führen (s. Kap. 3.1) und so pro-inflammatorische und apoptotische Effekte hervorrufen.

B19V-NS1 interagiert in humanen ECs außerdem mit dem Enzym Prostaglandin-Reduktase 1 (PTGR1; s. Kap. 3.3.4.1), das an Inaktivierung des chemotaktischen Faktors Leukotrien 4B beteiligt ist (Chou et al. 2007). Leukotrien 4B wiederum stimuliert die Produktion verschiedener proinflammatorischer Zytokine, aktiviert NF- κ B sowie Leukozyten und kann eine inflammatorische Reaktion steigern und verlängern (Crooks und Stockley 1998; Zhao et al. 2012). Möglicherweise hat B19V-NS1 einen hemmenden Einfluss auf PTGR1, was zur Verminderung des Leukotrien-Abbaus und folglich zur Förderung kontinuierlicher inflammatorischer Prozesse führen kann.

Die direkte Interaktion von B19V-NS1 mit Teilen der inflammatorischen Signaltransduktion wie GIGYF2 und PTGR1 könnte zu einer Aktivierung der pro-inflammatorischen Signalkaskaden p38-MAPK und p44/42-ERK und zu einer verlängerten Entzündungsreaktion unter Beteiligung der Leukotrien-Signalgebung führen und so zur Entstehung einer iCMP beitragen.

4.3.1.5 B19V-NS1-Assoziation mit weiteren zellulären Proteinen

Ein 6-Phosphofrukto-2-Kinase/Fruktose-2,6-Biphosphatase 2 (PFKFB2) ist ein Protein, das in der massenspektrometrischen Analyse als direkter Bindungspartner von B19V-NS1 identifiziert wurde (s. Kap. 3.3.4.1). Diese Herz-spezifische Isoform ist an der Kontrolle des Glukosemetabolismus beteiligt, dessen Deregulation zur Induktion von Apoptose führen kann (Carlet et al. 2010). Zudem übt B19V regulatorische Einflüsse auf einen Glukose-Transporter aus (Lang 2012, bisher unveröffentlicht). Weiter Effekte von B19V auf Faktoren der Verstoffwechslung von Glukose sind bisher nicht beschrieben. Ob B19V-NS1 durch die Interaktion mit PFKFB2 apoptotische Prozesse in Gang setzen könnte, muss in weiteren Experimenten überprüft werden.

Ein weiterer identifizierter Interaktionspartner von B19V-NS1 spielt bei der Aufrechterhaltung von Adhäsionsverbindungen zwischen ECs eine wichtige Rolle. Es handelt sich um das das Mikrotubuli-assoziierte *Calmodulin-regulated spectrin-associated protein 3* (CAMSAP3; s. Kap. 3.3.4.1; Meng et al. 2008). Die Interaktion von B19V-NS1 mit CAMSAP3 könnte Einfluss auf die Zell-Zell-Kontakte und somit die Integrität der ECs haben.

Diese erste Interaktionsstudie von B19V-NS1 mit Bestandteilen des zellulären Proteoms lieferte initiale Ergebnisse, die Ansatzpunkte für weitere molekulare Grundlagenforschungen einer B19V-Infektion des Herzens liefert. Bei der Einordnung der vorliegenden Ergebnisse konnten Assoziationen von B19V-NS1 zum Proteintransport und zur Proteinprozessierung, zur viralen Replikation, zu Apoptose und der Aktivierung von pro-inflammatorischer Signalgebung sowie der indirekten Beeinflussung des MAPK-Signalwegs aufgezeigt werden.

Anhand dieser ersten Befunde bedarf es einer weiteren Verifizierung der identifizierten Bindungspartner mit Hilfe von bspw. *Yeast two-hybrid*- oder *Förster (Fluorescence) resonance energy transfer* (FRET)-Analysen und funktionellen Untersuchungen, um die biologische Signifikanz der Interaktionen definieren zu können. In weiteren Experimente muss das B19V-NS1-„Interaktom“ anderer Zellarten wie den permissiven UT-7/EPO-Zellen oder primären erythroiden Progenitorzellen charakterisiert werden, um mögliche Gemeinsamkeiten oder Unterschiede zu identifizieren. Dies wird dazu beitragen zellspezifische Mechanismen besser zu verstehen, die zur Pathophysiologie einer B19V-Infektion des Herzmuskels beitragen.

4.4 Mutationsanalysen von Parvovirus B19

Die Genotypisierung von Viren ist wichtig, da Sequenzvariationen Einfluss auf virale Prozesse wie Virusreplikation und -persistenz und die klinische Erscheinungsform haben können (Pujol et al. 2009). Bereits von anderen Viren, wie dem Hepatitis B Virus, konnte gezeigt werden, dass Mutanten, die vom Wildtyp in funktionellen Bereichen abweichen, eine veränderte Virusreplikation aufweisen (Qin et al. 2011). Auch bei B19V kann solch eine genetische Variation Einfluss auf die Persistenz des Virus und den klinischen Verlauf der Infektion haben, insbesondere bei der B19V-assoziierten Myokarditis (Bock et al. 2010).

Für die Studien zur Mutationsanalyse des parvoviralen Genoms wurden Patientenproben der Routinediagnostik der Molekularen Pathologie des Instituts für Pathologie und Neuropathologie Tübingen retrospektiv und vollständig anonymisiert verwendet. Von der Routinediagnostik analysierte DNA-Isolate aus Herzbiopsien von Patienten mit B19V-Infektion wurden zu molekulargenetischen Untersuchungen im Rahmen der vorliegenden Arbeit eingesetzt.

Wie in Kap. 4.1.2 und in verschiedenen Publikationen bereits gezeigt werden konnte (Jindal et al. 1994; Momoeda et al. 1994), bewirkten artifizielle Mutationen des Effektorproteins B19V-NS1 eine Veränderung dessen Wirkungsweise. Da die DNA-Sequenz des Virus auch in der Umwelt hochvariabel ist (Norja et al. 2008), könnten funktionsverändernden Mutationen auch bei Patienten mit B19V-Infektion auftauchen und dort eine veränderten klinische Manifestation hervorrufen. Daher wurden Sequenzen der B19V-Genotypen 1 und 2 auf patientenspezifische Mutationen in der NTP-Bindedomäne untersucht und mit dem klinischen Bild korreliert. In diesen Untersuchungen fiel eine erhöhte Sequenzvariabilität der B19V-Genotyp-2-Infektionen auf. Da in neueren Studien gezeigt wurde, dass sich die beiden B19V-Genotypen 1 und 3 in Subtypen untergliedern (Corcoran et al. 2010; Hübschen et al. 2009; Parsyan et al. 2007; Toan et al. 2006a), gab diese Datenlage Grund zur Annahme für einen möglichen neuen Subtyp des Genotyps 2. Daher wurde der gesamte kodierende Bereich von B19V der Genotypen 1 und 2 sowie der hochvariable Bereich NS1-VP1u des Genotyps 2 auf Sequenzvariabilität untersucht.

4.4.1 Mutationen der NTP-Bindestelle

B19V-NS1 übt in der Zelle Effekte aus, die u.a. mit dessen Fähigkeit verknüpft sind, an DNA zu binden und mit dieser zu interagieren. Zu diesen Effekten zählen die Aktivierung von viralen und zellulären Promotoren, Funktionen bei der viralen Replikation als Helikase und Nickase, Modulation von Signalwegen wie bspw. dem JAK/STAT-Signalweg und die Induktion von zytotoxischen und apoptotischen Prozessen in der Zelle (Duechting et al. 2008; Nüesch 2006). Eine funktionelle Mutation der NTP-Bindestelle kann zur vollständigen Inhibierung von zytotoxischen und apoptotischen Eigenschaften von B19V-NS1 in ECs

führen (Momoeda et al. 1994; Poole et al. 2011) und könnte so möglicherweise einen Einfluss auf Entzündungsprozesse im Myokard haben. In Kap. 4.1.2 wurde ein Einfluss einer artifiziellen Mutation der NTP-Domäne auf den p38-MAPK-Signalweg beobachtet, der im Zusammenhang mit der Entstehung pathophysiologischer Prozesse in ECs stehen kann. Um eine mögliche Verbindung zwischen Mutationen der NTP-Bindestelle in B19V-NS1 und der klinischen Manifestation des Virus herzustellen, wurde die Sequenz von patientenspezifischen DNA-Isolaten der B19V-Genotypen 1 und 2 auf Mutationen im Bereich der NTP-Bindestelle von B19V-NS1 untersucht.

Der 288 bp umfassende DNA-Abschnitt der NTP-Bindestelle von B19V-NS1 wies bei der Analyse von 51 Sequenzen der Genotypen B19V-1 und -2 einen hohen Grad an Homogenität auf. Die Varianz betrug zwischen 0,9 und 1,5 % auf Nukleotid- und zwischen 0,1 und 0,2 % auf Aminosäureebene. Punktmutationen, die einen Aminosäureaustausch zur Folge hatten, häuften sich vor allem im Bereich zwischen den Konsensussequenzen A, B und C der NTP-Binde- und Helikasedomäne (T334S, A404P, L337S; s. Kap. 3.4.1, Abb. 47). Dies steht im Einklang mit zuvor gemachten Beobachtungen (Servant-Delmas et al. 2009).

Sowohl diese als auch drei weitere Mutationen, die in der Stelle B' detektiert werden konnten (P392L, T393P, R394W), sind bisher noch nicht beschrieben oder haben keine funktionelle Bedeutung. In der Domäne A der NTP-Bindestelle, die in einer Vielzahl von anderen Virenspezies wie den Adeno-assoziierten Viren, dem ADV (*Aleutian disease virus*) oder MVM, hoch konserviert ist, wurde die Aminosäuresubstitution K334E nachgewiesen, die bereits mehrfach als funktionsverändernde Mutante beschrieben wurde (Momoeda et al. 1994; Nakashima et al. 2004). Die Mutante K334E ist durch den Austausch eines Lysins durch ein Glutamat auf Position 334 von B19V-NS1 gekennzeichnet. Das positiv geladene Lysin erleichtert an dieser Stelle zusammen mit den Dipolkräften der alpha-Helix in B19V-NS1 die Bindung zu den negativ geladenen Phosphatgruppen von Nukleosidtriphosphaten (Rossmann et al. 1974). Ein Austausch in eine ungeladene Aminosäure, wie im vorliegenden Fall zu Glutamat, führt somit zum Funktionsverlust dieser Bindung und sekundär zur Aufhebung von B19V-NS1-induzierter Zytotoxizität und Apoptose (Momoeda et al. 1994).

Ein Vergleich mit klinischen Daten der Biopsieprobe zeigte das klinische Bild einer chronischen Myokarditis ohne Inflammation und koronarer Herzerkrankung. Die Viruslast lag am Detektionslimit. Die geringe Viruslast und das Fehlen einer Inflammation könnten auf den Effekt eines defekten NS1-Proteins zurückzuführen sein, das weder als transkriptioneller Aktivator (Momoeda et al. 1994; Raab et al. 2002; Vassias et al. 1998) noch als Initiator der Replikation wirkt (Doerig et al. 1990; Morita und Sugamura 2002).

4.4.2 Intergenotypische Divergenzen im kodierenden Genombereich des Parvovirus B19

Der kodierende Bereich des Genoms von B19V ist etwa 4830 bp lang und enthält die Leseraster für die drei Hauptproteine NS1, VP1 und VP2. In diesem Teil der Studie wurden die Variabilität von Nukleotid- und Aminosäuresequenzen zwischen Genotyp 1 und Genotyp 2 untersucht. Hierzu wurden 25 virale DNA-Sequenzen, die sowohl aus patientenspezifischen Isolaten als auch aus bereits veröffentlichten viralen DNA-Abschnitten beider Genotypen stammten, in einem Basenpaar-Abgleich von 4350 bp miteinander verglichen und auf Phylogenie sowie auf Mutationsfrequenz und –lokalisierung analysiert. Es zeigte sich, dass beide Genotypen im Phylogramm deutlich getrennte „Cluster“ bildeten (s. Kap. 3.4.2, Abb. 48) und sich auf Nukleotidebene in über 10 %, auf Aminosäureebene in 4,3 % voneinander unterschieden. Im Gegensatz dazu waren die Genotyp-Gruppen mit 1,1 % (B19V-1) und durchschnittlich 2 % (B19V-2) in sich homogen. Der Bereich des Genotyps 2 separierte sich weiterhin in die „Subcluster“ 2a und 2b, diese wiesen jedoch zum Prototyp des Genotyps 2 B19V-LaLi keine signifikante Varianz (1,8 bzw. 2,3 % auf Nukleotidebene) auf, die zur Abspaltung eines neuen Subtyps (> 5 %) geführt hätte (Parsyan et al. 2007; Toan et al. 2006a; s. Kap. 3.4.2, Tabelle 21).

Bei der Analyse der Mutationshäufigkeit entlang des B19V-Genoms mittels Entropie-Plot fiel auf, dass bestimmte DNA-Regionen mit verstärkter oder geringerer Mutationsrate nachweisbar waren (s. Kap. 3.4.2, Abb. 49). Mutations-Hotspots zeigten sich jeweils ausgehend vom Startkodon B19V-NS1 bei etwa 500 nt - 900 nt, 1800 nt - 2100 nt und 3400 nt - 4300 nt, wohingegen hoch konservierte Bereiche bei 1400 nt - 1700 nt und 2400 nt - 2750 nt auszumachen waren. Diese Ergebnisse decken sich exakt mit Untersuchungen von Norja und Kollegen (2008), die Bereiche hoher Sequenzhomogenität mit funktionellen Regionen von B19V-NS1 und B19V-VP1/2 in Zusammenhang brachten. Auch andere Veröffentlichungen besagen, dass funktionelle Bereiche der parvoviralen Proteine, unabhängig vom B19V-Genotyp, hoch konserviert sind (Servant-Delmas et al. 2009). Oben genannte minimal variable DNA-Abschnitte ließen sich mit dem Kodierungsbereich für das 7,5 kDa Protein und der Phospholipase A2-Domäne von B19V-VP1u assoziieren.

4.4.3 Betrachtung des hochvariablen NS1/VP1u-Bereichs innerhalb der Genotyp-2-Varianten von Parvovirus B19

Da bestimmte Sequenzabschnitte des B19V-Genoms eine erhöhte Variabilität aufweisen und die Mutationsrate somit lokal variiert (Erdman et al. 1996; Norja et al. 2008), wurde ein Genom-Bereich zwischen dem C-Terminus von B19V-NS1 und der -VP1u-Region analysiert, der in der Fachliteratur als hochvariabel beschrieben wurde (Fukada et al. 2000; Kivovich et

al. 2012; Toan et al. 2006b). Der 320 bp umfassende DNA-Bereich wurde in 48 Sequenzen des Genotyps 2 verglichen und phylogenetisch analysiert. Zwei distinkte 2a-„Cluster“ waren neben einem 2b-„Cluster“ und einer inhomogenen Gruppierung zu erkennen (S. Kap. 3.4.3, Abb. 50). Sequenzvergleiche ergaben eine Varianz der Varianten 2a und 2b zum Prototyp B19V-LaLi von je 3,3 % bzw. 3,4 % auf Nukleotid- und 2,0 % bzw. 2,4 % auf Aminosäureebene (s. Kap. 3.4.2, Tabelle 21). Bei der Analyse dieses DNA-Abschnitts zeigte sich eine deutlich erhöhte Variabilität im Vergleich zum B19V-Gesamtgenom. Die Varianz reichte jedoch nicht aus, um eine Untergliederung in zwei neue Subtypen zu definieren.

Untersuchungen dieses DNA-Bereichs im Genotyp 1 einer vietnamesischen Population konnten ein signifikanter Unterschied von 5 - 6 % im Vergleich zur Prototypsequenz aufdecken, was somit die Unterteilung in die zwei Subtypen 1a und 1b zur Folge hatte (Toan et al. 2006a). Später wurde in einer südafrikanischen Patientenkohorte anhand weiterer Sequenzvarianzen ein dritter B19V-1-Subtyp identifiziert (Corcoran et al. 2010). Genotyp 3 variiert sogar so stark, dass der gesamte kodierende Bereich intragenotypisch 5 - 6 % Sequenzvariabilität aufweist und so eine Klassifizierung in neue Subtypen zulässt (Parsyan et al. 2007). Die hohe genetische Diversität des B19V-Genotyps 3 mit verschiedenen „Clustern“ und den Subtypen 3a und 3b im Vergleich zu B19V-1 und -2 deutet auf eine längere evolutionäre Entwicklung hin, die vermutlich in Afrika ihren Ursprung hatte (Hübschen et al. 2009). Dieser älteste Genotyp breitet sich gegenwärtig von Afrika und Südamerika pandemisch aus (Sanabani et al. 2006; Servant-Delmas et al. 2009) und wurde bereits in den USA, auf den britischen Inseln, in vielen Ländern des europäischen Festlandes und auch in Deutschland nachgewiesen (Cohen et al. 2006; Hübschen et al. 2009; Rinckel et al. 2009).

Die hohe Mutationsrate ist charakteristisch für Mitglieder der *Parvoviridae* (Lukashov und Goudsmit 2001; Shackelton et al. 2005) und besonders bei den Genotypen 1 und 3 zu beobachten. Diese Rate könnte durch die Replikationsvorgänge (10^{10} - 10^{13} GE/ml) während der frühen Phase einer B19V-Infektion erklärt werden (Heegaard et al. 1998). Das Vordringen von B19V-Genotyp 3 und die Substitution von Genotyp 2 durch Genotyp 1 führen zu einem Rückgang der B19V-Genotyp-2-Infektionen. Aufgrund der ungewöhnlichen Altersverteilung ist anzunehmen, dass neue B19V-2-Infektionen heute vermutlich hauptsächlich durch reaktivierte Primärinfektion verursacht werden (Norja et al. 2006). Diese Reduktion auf persistente Infektionen, die eine 3-fach geringere Mutationsrate als akute Infektionen aufweisen (Norja et al. 2008), schließt B19V-2 quasi aus dem evolutionären Prozess aus, was die geringere Sequenzvarianz und die nicht aufgetretene Subtypenbildung im Vergleich zu den anderen beiden Genotypen erklärt. Interessanterweise wurde jedoch beobachtet, dass persistente Infektionen von den B19V-Genotypen 1 und 3 mit einer Akkumulation von Punktmutationen und einem hohen Grad an genetischen Polymorphismen assoziiert sind (Candotti

et al. 2004; Gallinella et al. 2003; Hemauer et al. 1996; Lefrère et al. 2005). Dieser Effekt wird vermutlich durch die geringe, aber kontinuierliche Replikation über einen langen Zeitraum verursacht (Parsyan et al. 2007).

Der B19V-Genotyp 2 variierte zwar genetisch in hochvariablen DNA-Bereichen wie der NS1/VP1-Region um bis zu 3,4 % im Vergleich zum G2-Prototyp B19V-LaLi, eine Subtypenbildung wie in Genotyp 1 und 3 konnte jedoch nicht vorgenommen werden. B19V-2-Neuinfektionen treten vermutlich nicht mehr auf und Genotyp 2 wird immer weiter von den beiden andern Genotypen verdrängt. Dies hat zur Folge, dass der B19V-Genotyp 2 aus evolutionären Prozessen ausgeschlossen wurde und sich dadurch phylogenetisch nicht weiter verändern kann.

5 Zusammenfassung

Das humanpathogene Parvovirus B19 (B19V) wurde vor Kurzem als neu identifizierter Erreger entzündlicher Herzmuskelerkrankungen beschrieben. Die Infektion myokardialer Endothelzellen mit B19V kann mit einer endothelialen Dysfunktion und sekundärer Schädigung der Myozyten einhergehen, die zur inflammatorischen Kardiomyopathie (iCMP) führen kann. Das virale Effektorprotein NS1 des Parvovirus B19 ist essentiell für die Initiierung der viralen Replikation durch seine Helikase-, Nickase- und ATPase-Aktivität. Die Überexpression von B19V-NS1 wirkt zytotoxisch und kann Apoptose induzieren.

Molekulare Mechanismen, die zu einer Inflammation und der Entstehung einer B19V-iCMP führen können, sind bislang wenig verstanden. In der vorliegenden Arbeit wurde dementsprechend die inflammatorische Signaltransduktion, insbesondere der MAPK- und eNOS-Signalweg detailliert untersucht. Die durchgeführten Analysen haben gezeigt, dass B19V und B19V-NS1 in permissiven Megakaryozyten (UT-7/EPO) und semipermissiven Endothelzellen (hMEC-1) eine signifikante Dysregulation des MAPK-Signalwegs verursachen und insbesondere zu einer Aktivierung von p44/42-ERK und p38-MAPK führen kann. Durch Genexpressionsstudien konnte zudem eine Modulation von MAPK-assoziierten Genen beobachtet werden. Initiale Untersuchungen zum Einfluss von B19V-NS1 auf die Regulation des eNOS-Signalwegs zeigten eine starke Dysregulation von Zielgenen der eNOS-Signalgebung. Einen Effekt auf die Expression von eNOS konnte jedoch nicht gezeigt werden. Von Interesse war, auf welche Weise B19V-NS1 direkt oder indirekt in intrazelluläre Signalkaskaden eingreift. In Interaktionsstudien wurden elf direkte Bindungspartner von B19V-NS1 identifiziert, die mit pathophysiologischen und viralen Prozessen in Verbindung gebracht werden konnten.

Die genetische Varianz von Parvoviren ist groß. Zudem haben Genmutationen Einfluss auf virale Prozesse und die klinische Manifestation einer Virusinfektion. Daher wurden patientenspezifische B19V-Isolate auf Mutation in funktionellen Domänen von B19V-NS1 untersucht. Eine beschriebene Mutation (K334E), durch die B19V-NS1 seine zytotoxischen Eigenschaften verliert, konnte mit dem Fallbeispiel eines milden Krankheitsverlaufs assoziiert werden. Bei Untersuchungen zur Divergenz des B19V-Genoms fiel eine gesteigerte Variabilität des Genotyps 2 auf. Folgende Analysen der hypervariablen B19V-Region NS1-VP1u des Genotyps 2 resultierten in der Differenzierung von zwei genetischen Varianten 2a und 2b.

Die Ergebnisse aus den Arbeiten zur vorliegenden Doktorarbeit belegen eine Dysregulation der MAPK-Signaltransduktion und der eNOS-Signalkaskaden durch B19V, wodurch proapoptotische und proinflammatorische Prozesse in Gang gesetzt werden, die die Entwicklung der B19V-assoziierten inflammatorischen Kardiomyopathie mit endothelialer Dysfunktion erklären helfen und künftig für innovative diagnostische und therapeutische Optionen einer B19V-iCMP eingesetzt werden können.

6 Anhang

6.1 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzungen der Genbezeichnungen der Genexpressionsarrays zu den MAPK- und eNOS-Signalwegen (s. Kap. 3.1.8.2 und 3.2.1) befinden sich in Tabelle 22 und Tabelle 23.

Ach	Acetylcholin
ANKFY1	<i>Ankyrin repeat and FYVE domain-containing protein</i>
ASK1	<i>Apoptosis signal regulating kinase</i>
ATM/ATR	<i>Ataxia telangiectasia related/mutated</i>
ATP	Adenosintriphosphat
ATPase	Adenosintriphosphatase
AS	Aminosäure
ASK	<i>Apoptosis signal regulating kinase</i>
B19V	Parvovirus B19
Bcl	<i>B-cell lymphoma</i>
BDK	Bradykinin
bp	Basenpaare
BSA	<i>Bovine serum albumine</i>
C-Terminus	Carboxy-Terminus
Ca ²⁺	Calcium
Calm	Calmdolulin
CamKII	Calmodulin-Kinase II
CAMPSAP3	<i>Calmodulin-regulated spectrin-associated protein</i>
Cav1	Caveolin
(C)CLB	<i>(Complete) Cell Lysis Buffer</i>
cdc	<i>Cell division control protein</i>
Cdk	<i>Cyclin depentant kinase</i>
cDNA	<i>Complementary desoxyribonuclein acid</i>
cGMP	<i>Cyclic guanosin monophosphate</i>
CMP	Kardiomyopathie
CNG	<i>Cyclic Nucleotid Gated Ion Channel</i>
Ct-Wert	<i>Threshold Cycle-Wert</i>
DAG	Diacylglycerol
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
E2F	<i>Transcription factor E2F</i>
EBV	Eppstein-Barr-Virus
EC	Endothelzelle
ECGS	<i>endothelial cell growth supplement</i>
ECM	Extracellular Matrix
ED	Endotheliale Dysfunktion
EDG	<i>endothelial differentiation gene</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>enhanced green fluorescent protein</i>
eNOS	endotheliale Stickstoffoxid-Synthase
EPO	Erythropoietin
ERK	<i>Extracellular signaling related kinase</i>
EtOH	Ethanol
FCR2	<i>Fragile X mental retardation syndrome-related protein 2</i>
FCS	<i>Fetal Calf Serum</i>
FW	<i>Forward (Primer)</i>

GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase
G-Protein	Guanosintriphosphat-bindendes Protein
GE	Genomäquivalente
GIGYF2	<i>PERQ amino acid-rich with GYF domain-containing protein 2</i>
GSK3-β	Glycogensynthasekinase3-β
GTF2I	<i>General transcription factor II-I</i>
HBV	Hepatitis B Virus
HCl	Salzsäure
HCMV	Humanes Cytomegalie-Virus
HCV	Hepatitis C Virus
HDAC	Histon-Deacetylase
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic Acid</i>
HHV6	Humanes Herpesvirus 6
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
hMEC-1	Humane mikrovaskuläre Endothelzellen
HRP	Meerrettichperoxiase
HSP	<i>Heat shock protein</i>
HSV-1	Herpes simplex Virus Typ 1
HUVEC	<i>human umbilicord vascular endothelial cells</i>
iCMP/CMP	Inflammatorische/chronisch dilatative Kardiomyopathie
IFN _γ	Interferon-γ
IL	Interleukin
iNOS	Induzierbare Stickstoffoxid-Synthase
IP3	Inositoltriphosphat
JAK/STAT	<i>Januskinase/ Signal transducer and activator of transcription</i>
JNK	C-Jun N-terminale Kinase
Kb	Kilobasenpaar
kDa	Kilodalton
KDR	<i>kinase insert domain receptor</i>
LB	<i>lysogeny broth</i>
LC-MS	Flüssigchromatograph/Massenspektrometer
LIG3	<i>DNA ligase 3</i>
LRP	<i>LDL receptor related protein</i>
M	Molar
mA	Milliampere
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPKK(K)	MAPK Kinase (Kinase)
MEK	MAPK/ERK Kinase
MKK	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase</i>
MLK	<i>Mixed lineage kinase</i>
mM	Millimolar
MNK	<i>MAPK interacting Kinase</i>
Mos	<i>Moloney murine sacroma</i>
mRNA	<i>Messenger RNA</i>
MS	Massenspektrometer/Massenspektrometrie
MVM	<i>Minute virus of mice</i>
N-Terminus	Amino-Terminus
Na ⁺ -K ⁺ -ATPase	Natrium-Kalium-Adenosintriphosphatase
NF-AT	<i>Nuclear factor of activated T-cells</i>
NF-κB	<i>Nuclear factor κB</i>
NLK	<i>Nemo-like kinase</i>
NLS	Nukleäres Lokalisationssignal
nNOS	Neuronale Stickstoffoxid-Synthase
NO	Stickstoffmonoxid
NOS	NO-Synthase
NS1	Nicht-Sturkturprotein 1

NTP	Nukleosidtriphosphat
PARP	Poly(ADP-Ribose) Polymerase
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i>
PCNA	<i>proliferating cellular nuclear antigen</i>
PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
Pen/Strep	Penicillin/Streptomycin
PFKFB2	<i>6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-biphosphatase 2</i>
PI3K	Phosphatidylinositol 3-Kinase
PIAS	<i>Protein inhibitor of activated STAT</i>
PIP2	Phosphatidylinositol 4,5-Bisphosphat
PKA	cAMP-abhängigen Proteinkinasen
PKC	Proteinkinase C
PLA2	Phospholipase A2
PLC	Phospholipase C
PSMD12	<i>26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 12</i>
PTGR1	<i>Prostaglandin reductase 1</i>
-R	Rezeptor
Raf	<i>Rapidly accelerated fibrosarcoma</i>
RFC	<i>Replication factor C</i>
RT-PCR	Reverse Transkription PCR
REM	Rasterelektronenmikroskopie
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPA1	<i>Replication protein A 70 kDa DNA-binding subunit</i>
rpm	<i>round per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur; Reverse Transkriptase
RTK	Rezeptor-Tyrosin-Kinase
RV	<i>Reverse (Primer)</i>
S1P	Sphingosin-1-Phosphat
SAPK	<i>Stress-activated protein kinase</i>
SDS-PAGE	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese
Ser/Thr	Serin/Threonin
sGUCY	<i>Soluble guanylat cyclase</i>
SH2	<i>Src-homology domain</i>
SILAC	<i>Stable isotope labeling by amino acids in cell culture</i>
SIV	Simian Immunodefizienzvirus
SOCS	<i>Suppressor of Cytokine Signaling</i>
SOS	<i>Son of sevenless</i>
ssDNA	<i>single strand DNA</i>
SV40	Simian Virus 40
TAO	<i>Thousand and one amino acid protein kinase</i>
Taq	<i>Thermophilus aquaticus</i>
TBS	Tris Buffered Saline
Tet	Tetracyclin
TF	Transkriptionsfaktor
TGF- β	<i>Transforming growth factor β</i>
TNF- α	Tumor Nekrose Faktor- α
Tpl2	<i>Tumor progression locus</i>
U	Unit (Enzymaktivität)
VEGF	<i>Vascular Endothelial Growth Factor</i>
VP	Virales Protein
VP1u	VP1unique

6.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1: Diagramm der Taxonomie der <i>Parvoviridae</i>	2
Abb. 2: B19V-Struktur	2
Abb. 3: Schema des B19V-Genoms	2
Abb. 4: Darstellung der Transkripte von B19V	2
Abb. 5: Schematischer Infektionszyklus von B19V in permissiven Zellen	2
Abb. 6: Schema der B19V-Infektion von erythroiden Vorläuferzellen des Knochenmarks	2
Abb. 7: Modell der B19V-NS1 Genexpression in permissiven und nicht-permissiven Zellen	2
Abb. 8: Manifestation der B19V-Infektion	2
Abb. 9: B19V-infiziertes Myokard	2
Abb. 10: Viruslasten von B19V in Endomyokardbiopsien von Patienten mit v.a. Myokarditis	2
Abb. 11: Schematische Darstellung der Endothelzellaktivierung	2
Abb. 12: Statistische Verteilung von Patienten mit B19V-Genotyp-1 und -2-Infektion	2
Abb. 13: Sequenzvariabilität des B19V-Genoms	2
Abb. 14: Putative Sekundärstruktur der NTP-Bindedomäne von B19V-NS1	2
Abb. 15: Signalwege der Zellzykluskontrolle	2
Abb. 16: Schematisch Darstellung der zellulären Ereignisse in permissiven UT-7/EPO-Zellen nach Infektion mit B19V	2
Abb. 17: Modulation der JAK-/STAT-Signalkaskade bei B19V-Infektion	2
Abb. 18: MAPKs: Signalkaskade und Proteinstruktur	2
Abb. 19: Rolle von p38-MAPK beim Zellzyklusarrest	2
Abb. 20: eNOS-Signalweg	2
Abb. 21: Die Rolle von Kinasen+ Phosphatasen bei der Aktivierung von eNOS durch Mehrfach-phosphorylierungen	2
Abb. 22: Plasmidkarten der Expressionsvektoren pcDNA-NS1 und pcDNA3.1	2
Abb. 23: Schematische Darstellung des induzierbaren Tet-on-Expressionssystems	2
Abb. 24: Plasmidkarten der Vektoren des induzierbaren Tet-Expressionssystems	2
Abb. 25: Proteinstandard PageRuler™ Plus Prestained von Fermentas	2
Abb. 26: <i>Multiple Cloning Site</i> des Vektors pEF-FLAG	2
Abb. 27: Bestimmung der Insert-Ausrichtung mittels PCR	2
Abb. 28: Gerichtete Mutagenese	2
Abb. 29: pcDNA-FLAG-Vektoren	2
Abb. 30: Vereinzeln von zellulären Klonen	2
Abb. 31: Darstellung der Anreicherung markierter Aminosäuren	2
Abb. 32: Differenzierung der B19V- Genotypen	2
Abb. 33: Relative qPCR-Untersuchung zum Expressionsnachweis von NS1-mRNA	2
Abb. 34: Western Blot Analyse von Phospho-p38-MAPK (p-p38) , p38-MAPK (p38) und GAPDH	2
Abb. 35: Western Blot Analyse von Phospho-p44/42-ERK (p-p44/42) , p44/42-ERK (p44/42) und GAPDH.	2
Abb. 36: Aktivierung von Phospho-p38-MAPK (p-p38), p38-MAPK (p38), Phospho-p44/42-ERK (p-p44/42) und p44/42-ERK (p44/42) durch die Mutante B19V-NS1-K334E.	2
Abb. 37: Relative qPCR-Untersuchung zum Expressionsnachweis von NS1 und VP2	2
Abb. 38: Western Blot Analyse von Phospho-p38-MAPK (p-p38), p38-MAPK (p38) und GAPDH.	2
Abb. 39: Western Blot Analyse von Phospho-p44/42-ERK (p-p44/42), p44/42-ERK (p44/42) und GAPDH.	2
Abb. 40: Mikroskopische Fluoreszenz- und Hellfeldaufnahmen von stabilen, induzierbaren hMEC-NS1- und hMEC-1-Kontrollzellen.	2
Abb. 41: Relative qPCR-Untersuchung zum Expressionsnachweis von B19V-NS1-mRNA in nicht induzierten und induzierten hMEC-NS1-Zellen	2
Abb. 42: Expressionsprofil von 84 Zielen des MAPK-Signalwegs nach Induktion von B19V-NS1	2
Abb. 43: Expressionsprofil von 92 Genen des eNOS-Signalwegs nach Induktion von B19V-NS1	2
Abb. 44: Nachweis der transfizierten FLAG-Plasmid-DNA	2
Abb. 45: PCR-Analyse der cDNA aus stabilen hMEC-NS1-FLAG- bzw. hMEC-FLAG-NS1-Zelllinien	2
Abb. 46: Western Blot Analyse der Ausgangs- und Endprodukte der FLAG-Aufreinigung	2
Abb. 47: Aminosäure-(AS)-Sequenz-Abgleich der NTP-Bindestelle in B19V-NS1	2
Abb. 48: Phylogenetische Analyse der Kompletengenomsequenzen von B19V Genotyp 1 und 2	2
Abb. 49: Variationsanalyse der Kompletengenomsequenzen von B19V Genotyp 1 und 2	2
Abb. 50: Phylogenetische Analyse der NS1/VP1u-Region von B19V-Genotyp 2-Isolaten	2
Abb. 51: Lysophospholipid-Signalgebung	2

Abb. 52: Interaktion von RPA und MVM-NS1..... 2

6.3 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Erkrankungen, die in Zusammenhang mit einer B19V-Infektionen auftreten.....	2
Tabelle 2: Primer und Sonde der TaqMan-qPCR zur Bestimmung des Virustiters	2
Tabelle 3: qPCR-Bedingungen zur Bestimmung des Virustiters.....	2
Tabelle 4: RT-Reaktionsbedingungen zur Bestimmung der NS1-Expression	2
Tabelle 5: Primer und Sonde der TaqMan-qPCR zur Bestimmung der relativen NS1-Expression.....	2
Tabelle 6: qPCR-Bedingungen für die Durchführung des Profiler-Arrays.....	2
Tabelle 7: SDS-Polyacrylamid-Gele.....	2
Tabelle 8: Verwendete primäre und sekundäre Antikörper	2
Tabelle 9: Bedingungen der Gradienten-PCR zur Etablierung der Mlu-Schnittstellenprimer für die Klonierung von pEF-FLAG-NS1	2
Tabelle 10: Primer für die Klonierung von pEF-FLAG-NS1.....	2
Tabelle 11: PCR-Bedingungen zur Amplifikation von isolierter DNA	2
Tabelle 12: Primer zur Bestimmung der Insert-Ausrichtung mittels PCR.....	2
Tabelle 13: Bedingungen der Gradienten-PCR zur gerichteten Mutagenese der <i>Xba I</i> -Schnittstelle in pEF-FLAG	2
Tabelle 14: Primer für die erichtete Mutagenese von pEF-FLAG	2
Tabelle 15: Primer für die Klonierung von pEF-NS1-FLAG.....	2
Tabelle 16: Primer für die Sequenzierung von pcDNA-FLAG-Vektoren mit NS1-Insert	2
Tabelle 17: Primer zum Nachweis der FLAG-Plasmide in stabilen hMEC-1-Zellen	2
Tabelle 18: Primer für die Sequenzierung von B19V-Genomen	2
Tabelle 19: Bedingungen für die Sequenzierungs-PCR	2
Tabelle 20: Massenspektrometrische Auswertung der Interaktionsstudie von B19V-NS1 mit zellulären Proteinen	2
Tabelle 21: Inter- und intragenotypische Sequenzvarianzen (Nukleotide und Aminosäuren)	2
Tabelle 22: RT ² -Profiler Array MAPK Signalweg.....	2
Tabelle 23: Real-Time TaqMan PCR-Array eNOS Signalweg	2

6.4 Auflistung aller untersuchten Zielgene der MAPK- und eNOS-Signalwege

6.4.1 Untersuchte Gene der MAPK-Signalweg RT²-Profiler Array Analysen

Tabelle 22: RT²-Profiler Array MAPK Signalweg

Farbig unterlegte Gene sind signifikant reguliert und in Kap. 3.1.8.2 beschrieben sowie in Kap. 4.1.5 diskutiert.

Symbol	Beschreibung
ARAF	<i>V-raf murine sarcoma 3611 viral oncogene homolog</i>
ATF2	<i>Activating transcription factor 2</i>
BRAF	<i>V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1</i>
CCNA1	<i>Cyclin A1</i>
CCNA2	<i>Cyclin A2</i>
CCNB1	<i>Cyclin B1</i>
CCNB2	<i>Cyclin B2</i>
CCND1	<i>Cyclin D1</i>
CCND2	<i>Cyclin D2</i>
CCND3	<i>Cyclin D3</i>
CCNE1	<i>Cyclin E1</i>
CDC42	<i>Cell division cycle 42 (GTP binding protein, 25kDa)</i>
CDK2	<i>Cyclin-dependent kinase 2</i>
CDK4	<i>Cyclin-dependent kinase 4</i>
CDK6	<i>Cyclin-dependent kinase 6</i>

6 Anhang

CDKN1A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (p21, Cip1)</i>
CDKN1B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1B (p27, Kip1)</i>
Symbol	Beschreibung
CDKN1C	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 1C (p57, Kip2)</i>
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A (p16, inhibits CDK4)</i>
CDKN2B	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2B (p15, inhibits CDK4)</i>
CDKN2C	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2C (p18, inhibits CDK4)</i>
CDKN2D	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2D (p19, inhibits CDK4)</i>
CHUK	<i>Conserved helix-loop-helix ubiquitous kinase</i>
COL1A1	<i>Collagen, type I, alpha 1</i>
CREB1	<i>CAMP responsive element binding protein 1</i>
CREBBP	<i>CREB binding protein</i>
DLK1	<i>Delta-like 1 homolog (Drosophila)</i>
E2F1	<i>E2F transcription factor 1</i>
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
EGR1	<i>Early growth response 1</i>
ELK1	<i>ELK1, member of ETS oncogene family</i>
ETS1	<i>V-ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 1 (avian)</i>
ETS2	<i>V-Ets erythroblastosis virus E26 oncogene homolog 2 (avian)</i>
FOS	<i>FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog</i>
GRB2	<i>Growth factor receptor-bound protein 2</i>
HRAS	<i>V-Ha-ras Harvey rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
HSPA5	<i>Heat shock 70kDa protein 5 (glucose-regulated protein, 78kDa)</i>
HSPB1	<i>Heat shock 27kDa protein 1</i>
JUN	<i>Jun proto-oncogene</i>
KRAS	<i>V-Ki-ras2 Kirsten rat sarcoma viral oncogene homolog</i>
KSR1	<i>Kinase suppressor of ras 1</i>
MAP2K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
LAMTOR3	<i>Late adaptor, MAPK and MTOR activator 3</i>
MAP2K2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 2</i>
MAP2K3	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 3</i>
MAP2K4	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 4</i>
MAP2K5	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 5</i>
MAP2K6	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 6</i>
MAP2K7	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase 7</i>
MAP3K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 1</i>
MAP3K2	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 2</i>
MAP3K3	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 3</i>
MAP3K4	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase 4</i>
MAP4K1	<i>Mitogen-activated protein kinase kinase kinase kinase 1</i>
MAPK1	<i>Mitogen-activated protein kinase 1</i>
MAPK10	<i>Mitogen-activated protein kinase 10</i>
MAPK11	<i>Mitogen-activated protein kinase 11</i>
MAPK12	<i>Mitogen-activated protein kinase 12</i>
MAPK13	<i>Mitogen-activated protein kinase 13</i>
MAPK14	<i>Mitogen-activated protein kinase 14</i>
MAPK3	<i>Mitogen-activated protein kinase 3</i>
MAPK6	<i>Mitogen-activated protein kinase 6</i>
MAPK7	<i>Mitogen-activated protein kinase 7</i>
MAPK8	<i>Mitogen-activated protein kinase 8</i>
MAPK8IP2	<i>Mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 2</i>
MAPK9	<i>Mitogen-activated protein kinase 9</i>
MAPKAPK2	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 2</i>

MAPKAPK3	<i>Mitogen-activated protein kinase-activated protein kinase 3</i>
MAX	<i>MYC associated factor X</i>
Symbol	Beschreibung
MEF2C	<i>Myocyte enhancer factor 2C</i>
MKNK1	<i>MAP kinase interacting serine/threonine kinase 1</i>
MOS	<i>V-mos Moloney murine sarcoma viral oncogene homolog</i>
MST1	<i>Macrophage stimulating 1 (hepatocyte growth factor-like)</i>
MYC	<i>V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog (avian)</i>
NFATC4	<i>Nuclear factor of activated T-cells, calcineurin-dependent 4</i>
NRAS	<i>Neuroblastoma RAS viral (v-ras) oncogene homolog</i>
PAK1	<i>P21 protein (Cdc42/Rac)-activated kinase 1</i>
PRDX6	<i>Peroxiredoxin 6</i>
RAC1	<i>rho family, small GTP binding protein Rac1</i>
RAF1	<i>V-raf-1 murine leukemia viral oncogene homolog 1</i>
RB1	<i>Retinoblastoma 1</i>
SFN	<i>Stratifin</i>
SMAD4	<i>SMAD family member 4</i>
TP53	<i>Tumor protein p53</i>

6.4.2 Untersuchte Gene der eNOS-Signalweg mittels *Real-Time TaqMan PCR-Array Analysen*

Tabelle 23: Real-Time TaqMan PCR-Array eNOS Signalweg

Farbig unterlegte Gene sind signifikant reguliert und in Kap. 2.6.2 beschrieben sowie in Kap. 4.2 diskutiert.

Symbol	Beschreibung
18S	<i>Eukaryotic 18S rRNA</i>
GAPDH	<i>glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase</i>
HPRT1	<i>hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1</i>
GUSB	<i>glucuronidase, beta</i>
ACTA1	<i>actin, alpha 1, skeletal muscle</i>
ACTA2	<i>actin, alpha 2, smooth muscle, aorta</i>
ACTB	<i>actin, beta</i>
ACTG1	<i>actin, gamma 1</i>
ACTG2	<i>actin, gamma 2, smooth muscle, enteric</i>
ADCY1	<i>adenylate cyclase 1 (brain)</i>
ADCY3	<i>adenylate cyclase 3</i>
ADCY5	<i>adenylate cyclase 5</i>
ADCY6	<i>adenylate cyclase 6</i>
ADCY7	<i>adenylate cyclase 7</i>
AKT1	<i>v-akt murine thymoma viral oncogene homolog 1</i>
AQP1	<i>aquaporin 1 (Colton blood group)</i>
AQP2	<i>aquaporin 2 (collecting duct)</i>
AQP3	<i>aquaporin 3 (Gill blood group)</i>
AQP4	<i>aquaporin 4</i>
AQP5	<i>aquaporin 5</i>
BDKRB1	<i>bradykinin receptor B1</i>
BDKRB2	<i>bradykinin receptor B2</i>
CALM1	<i>calmodulin 1 (phosphorylase kinase, delta)</i>

6 Anhang

CALM2	<i>calmodulin 2 (phosphorylase kinase, delta)</i>
CALM3	<i>calmodulin 3 (phosphorylase kinase, delta)</i>
Symbol	Beschreibung
CASP3	<i>caspace 3, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CASP8	<i>caspace 8, apoptosis-related cysteine peptidase</i>
CAV1	<i>caveolin 1, caveolae protein, 22kDa</i>
CCNA1	<i>cyclin A1</i>
CCNA2	<i>cyclin A2</i>
CNGA1	<i>cyclic nucleotide gated channel alpha 1</i>
CNGA3	<i>cyclic nucleotide gated channel alpha 3</i>
CNGB1	<i>cyclic nucleotide gated channel beta 1</i>
CNGB3	<i>cyclic nucleotide gated channel beta 3</i>
DNM2	<i>dynamamin 2</i>
EGFR	<i>epidermal growth factor receptor (erythroblastic leukemia viral (v-erb-b) oncogene homolog, avian)</i>
ERBB2	<i>v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2, neuro/glioblastoma derived oncogene homolog</i>
ESR1	<i>estrogen receptor 1</i>
ESR2	<i>estrogen receptor 2 (ER beta)</i>
FLT1	<i>fms-related tyrosine kinase 1 (vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor receptor)</i>
FLT4	<i>fms-related tyrosine kinase 4</i>
GNAI1	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 1</i>
GNAI2	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 2</i>
GNAI3	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), alpha inhibiting activity polypeptide 3</i>
GNAS	<i>GNAS complex locus</i>
GNB1	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 1</i>
GNB2	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 2</i>
GNB3	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta polypeptide 3</i>
GNB5	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), beta 5</i>
GNG2	<i>guanine nucleotide binding protein (G protein), gamma 2</i>
GUCY1A3	<i>guanylate cyclase 1, soluble, alpha 3</i>
GUCY2C	<i>guanylate cyclase 2C (heat stable enterotoxin receptor)</i>
GUCY2D	<i>guanylate cyclase 2D, membrane (retina-specific)</i>
HSP90AA1	<i>heat shock protein 90kDa alpha (cytosolic), class A member 1</i>
HSPA4	<i>heat shock 70kDa protein 4</i>
IGF1	<i>insulin-like growth factor 1 (somatomedin C)</i>
IGF1R	<i>insulin-like growth factor 1 receptor</i>
IL2	<i>interleukin 2</i>
IL6	<i>interleukin 6 (interferon, beta 2)</i>
ITPR1	<i>inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 1</i>
ITPR2	<i>inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 2</i>
ITPR3	<i>inositol 1,4,5-triphosphate receptor, type 3</i>
KDR	<i>kinase insert domain receptor (a type III receptor tyrosine kinase)</i>
KIT	<i>v-kit Hardy-Zuckerman 4 feline sarcoma viral oncogene homolog</i>
LPAR1	<i>lysophosphatidic acid receptor 1</i>
LPAR2	<i>lysophosphatidic acid receptor 2</i>
NOS3	<i>nitric oxide synthase 3 (endothelial cell)</i>

NOSIP	<i>nitric oxide synthase interacting protein</i>
NOSTRIN	<i>nitric oxide synthase trafficker</i>
Symbol	Beschreibung
NPR1	<i>natriuretic peptide receptor A/guanylate cyclase A (atriuretic peptide receptor A)</i>
NPR2	<i>natriuretic peptide receptor B/guanylate cyclase B (atriuretic peptide receptor B)</i>
PDK1	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 1</i>
PDK2	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 2</i>
PDK3	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 3</i>
PDK4	<i>pyruvate dehydrogenase kinase, isozyme 4</i>
PIK3CA	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, alpha polypeptide</i>
PIK3CB	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, beta polypeptide</i>
PIK3CD	<i>phosphoinositide-3-kinase, catalytic, delta polypeptide</i>
PIK3R1	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 1 (alpha)</i>
PIK3R2	<i>phosphoinositide-3-kinase, regulatory subunit 2 (beta)</i>
PLCG1	<i>phospholipase C, gamma 1</i>
PLCG2	<i>phospholipase C, gamma 2 (phosphatidylinositol-specific)</i>
PRKACA	<i>protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, alpha</i>
PRKACB	<i>protein kinase, cAMP-dependent, catalytic, beta</i>
PRKAR1A	<i>protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type I, alpha (tissue specific extinguisher 1)</i>
PRKAR2A	<i>protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, alpha</i>
PRKAR2B	<i>protein kinase, cAMP-dependent, regulatory, type II, beta</i>
PRKG1	<i>protein kinase, cGMP-dependent, type I</i>
S1PR1	<i>sphingosine-1-phosphate receptor 1</i>
S1PR2	<i>sphingosine-1-phosphate receptor 2</i>
S1PR3	<i>sphingosine-1-phosphate receptor 3</i>
SLC7A1	<i>solute carrier family 7 (cationic amino acid transporter, y+ system), member 1</i>
STUB1	<i>STIP1 homology and U-box containing protein 1</i>
TGFB1	<i>transforming growth factor, beta 1</i>
VEGFA	<i>vascular endothelial growth factor A</i>
VEGFC	<i>vascular endothelial growth factor C</i>

6.5 Literaturverzeichnis

- Adamson**, A. L.; Darr, D.; Holley-Guthrie, E.; Johnson, R. A.; Mauser, A.; Swenson, J.; Kenney, S. (2000): Epstein-Barr Virus Immediate-Early Proteins BZLF1 and BRLF1 Activate the ATF2 Transcription Factor by Increasing the Levels of Phosphorylated p38 and c-Jun N-Terminal Kinases. In: *Journal of Virology* 74 (3), S. 1224–1233.
- Ades**, E. W.; Candal, F. J.; Swerlick, R. A.; George, V. G.; Summers, S.; Bosse, D. C.; Lawley, T. J. (1992): HMEC-1: establishment of an immortalized human microvascular endothelial cell line. In: *J. Invest. Dermatol* 99 (6), S. 683–690.
- Agbandje**, M.; Kajigaya, S.; McKenna, R.; Young, N. S.; Rossmann, M. G. (1994): The structure of human parvovirus B19 at 8 Å resolution. In: *Virology* 203 (1), S. 106–115.
- Alberts**, Bruce (2011): *Molekularbiologie der Zelle*. 5. Aufl. Weinheim: Wiley-VCH.
- Ambrosino**, C.; Iwata, T.; Scafoglio, C.; Mallardo, M.; Klein, R.; Nebreda, A. R. (2006): TEF-1 and C/EBPβ are major p38α MAPK-regulated transcription factors in proliferating cardiomyocytes. In: *Biochem. J* 396 (1), S. 163–172.
- Anderson**, M. J.; Higgins, P. G.; Davis, L. R.; Willman, J. S.; Jones, S. E.; Kidd, I. M. et al. (1985): Experimental parvoviral infection in humans. In: *J. Infect. Dis* 152 (2), S. 257–265.
- Anliker**, B.; Chun, J. (2004): Lysophospholipid G protein-coupled receptors. In: *J. Biol. Chem* 279 (20), S. 20555–20558.
- Apcher**, G. S.; Heink, S.; Zantopf, D.; Kloetzel, P.-M.; Schmid, H.-P.; Mayer, R. J.; Krüger, E. (2003): Human immunodeficiency virus-1 Tat protein interacts with distinct proteasomal α and β subunits. In: *FEBS Lett* 553 (1-2), S. 200–204.
- Arbuthnot**, P.; Capovilla, A.; Kew, M. (2000): Putative role of hepatitis B virus X protein in hepatocarcinogenesis: Effects on apoptosis, DNA repair, mitogen-activated protein kinase and JAK/STAT pathways. In: *J Gastroenterol Hepatol* 15 (4), S. 357–368.
- Arnal**, J. F.; Dinh-Xuan, A. T.; Pueyo, M.; Darblade, B.; Rami, J. (1999): Endothelium-derived nitric oxide and vascular physiology and pathology. In: *Cell. Mol. Life Sci* 55 (8-9), S. 1078–1087.
- Ashworth**, T.; Roy, A. L. (2009): Phase specific functions of the transcription factor TFII-I during cell cycle. In: *Cell Cycle* 8 (4), S. 596–605.
- Aslanidis**, S.; Pырpasopoulou, A.; Kontotasios, K.; Doumas, S.; Zamboulis, C. (2008): Parvovirus B19 infection and systemic lupus erythematosus: Activation of an aberrant pathway? In: *Eur. J. Intern. Med* 19 (5), S. 314–318.
- Baccarini**, M. (2005): Second nature: biological functions of the Raf-1 "kinase". In: *FEBS Lett* 579 (15), S. 3271–3277.
- Barber**, S. A.; Bruett, L.; Douglass, B. R.; Herbst, D. S.; Zink, M. C.; Clements, J. E. (2002): Visna Virus-Induced Activation of MAPK Is Required for Virus Replication and Correlates with Virus-Induced Neuropathology. In: *Journal of Virology* 76 (2), S. 817–828.
- Baron**, U.; Freundlieb, S.; Gossen, M.; Bujard, H. (1995): Co-regulation of two gene activities by tetracycline via a bidirectional promoter. In: *Nucleic Acids Res* 23 (17), S. 3605–3606.
- Behrends**, C.; Sowa, M. E.; Gygi, S. P.; Harper, J. W. (2010): Network organization of the human autophagy system. In: *Nature* 466 (7302), S. 68–76.
- Berens**, C.; Hillen, W. (2003): Gene regulation by tetracyclines. Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. In: *Eur. J. Biochem* 270 (15), S. 3109–3121.
- Bernier**, S. G.; Haldar, S.; Michel, T. (2000): Bradykinin-regulated interactions of the mitogen-activated protein kinase pathway with the endothelial nitric-oxide synthase. In: *J. Biol. Chem* 275 (39), S. 30707–30715.
- Berns**, K. I.; Bohenzky, R. A. (1987): Adeno-associated viruses: an update. In: *Adv. Virus Res* 32, S. 243–306.

- Bitar, M. S.;** Ayed, A. K.; Abdel-Halim, S. M.; Isenovic, E. R.; Al-Mulla, F. (2010): Inflammation and apoptosis in aortic tissues of aged type II diabetes: amelioration with alpha-lipoic acid through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt- dependent mechanism. In: *Life Sci* 86 (23-24), S. 844–853.
- Bock, C.-T.;** Klingel, K.; Aberle, S.; Duechting, A.; Lupescu, A.; Lang, F.; Kandolf, R. (2005): Human parvovirus B19: a new emerging pathogen of inflammatory cardiomyopathy. In: *J. Vet. Med. B Infect. Dis. Vet. Public Health* 52 (7-8), S. 340–343.
- Bock, C.-T.;** Klingel, K.; Kandolf, R. (2010): Human parvovirus B19-associated myocarditis. In: *N. Engl. J. Med* 362 (13), S. 1248–1249.
- Bonvicini, F.;** Filippone, C.; Delbarba, S.; Manaresi, E.; Zerbini, M.; Musiani, M.; Gallinella, G. (2006): Parvovirus B19 genome as a single, two-state replicative and transcriptional unit. In: *Virology* 347 (2), S. 447–454.
- Bonvicini, F.;** Filippone, C.; Manaresi, E.; Zerbini, M.; Musiani, M.; Gallinella, G. (2008): Functional analysis and quantitative determination of the expression profile of human parvovirus B19. In: *Virology* 381 (2), S. 168–177.
- Bonvicini, F.;** Manaresi, E.; Di Furio, F.; Falco, L. de; Gallinella, G. (2012): Parvovirus b19 DNA CpG dinucleotide methylation and epigenetic regulation of viral expression. In: *PLoS ONE* 7 (3), S. e33316.
- Boo, Y. C.;** Hwang, J.; Sykes, M.; Michell, B. J.; Kemp, B. E.; Lum, H.; Jo, H. (2002): Shear stress stimulates phosphorylation of eNOS at Ser(635) by a protein kinase A-dependent mechanism. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 283 (5), S. H1819-28.
- Boomer, J. S.;** Tan, T.-H. (2005): Functional interactions of HPK1 with adaptor proteins. In: *J. Cell. Biochem* 95 (1), S. 34–44.
- Borbiev, T.;** Birukova, A.; Liu, F.; Nurmukhambetova, S.; Gerthoffer, W. T.; Garcia, J. G. N.; Verin, A. D. (2004): p38 MAP kinase-dependent regulation of endothelial cell permeability. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 287 (5), S. L911-8.
- Borreda, D.;** Palomera, S.; Gilbert, B.; Lienhardt, A.; Lumley, L. de (1992): A propos de vingt-quatre observations d'infections à parvovirus humain B19 chez l'enfant. In: *Ann Pediatr (Paris)* 39 (9), S. 543–549.
- Boucher, M.-J.;** Jean, D.; Vézina, A.; Rivard, N. (2004): Dual role of MEK/ERK signaling in senescence and transformation of intestinal epithelial cells. In: *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol* 286 (5), S. G736-46.
- Bottazzi, M. E.;** Zhu, X.; Böhmer, R. M.; Assoian, R. K. (1999): Regulation of p21(cip1) expression by growth factors and the extracellular matrix reveals a role for transient ERK activity in G1 phase. In: *J. Cell Biol* 146 (6), S. 1255–1264.
- Brkic, S.;** Bogavac, M. A.; Simin, N.; Hrnjakovic-Cvetkovic, I.; Milosevic, V.; Maric, D. (2011): Unusual high rate of asymptomatic maternal parvovirus B19 infection associated with severe fetal outcome. In: *J. Matern. Fetal. Neonatal. Med* 24 (4), S. 647–649.
- Broliden, K.;** Tolfvenstam, T.; Norbeck, O. (2006): Clinical aspects of parvovirus B19 infection. In: *J. Intern. Med* 260 (4), S. 285–304.
- Brown, K.E.** (2005): The genus Erythrovirus. In: Kerr J, Cotmore SF, Bloom ME, Linden RM, Parrish CR, eds. Parvoviruses. London, United Kingdom: Hodder Arnold;25-45
- Brown, K. E.** (2010): The expanding range of parvoviruses which infect humans. In: *Rev. Med. Virol* 20 (4), S. 231–244.
- Brown, K. E.;** Anderson, S. M.; Young, N. S. (1993): Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. In: *Science* 262 (5130), S. 114–117.
- Brown, K. E.;** Hibbs, J. R.; Gallinella, G.; Anderson, S. M.; Lehman, E. D.; McCarthy, P.; Young, N. S. (1994a): Resistance to parvovirus B19 infection due to lack of virus receptor (erythrocyte P antigen). In: *N. Engl. J. Med* 330 (17), S. 1192–1196.
- Brown, K. E.;** Mori, J.; Cohen, B. J.; Field, A. M. (1991): In vitro propagation of parvovirus B19 in primary foetal liver culture. In: *J. Gen. Virol* 72 (Pt 3), S. 741–745.
- Brown, K. E.;** Young, N. S.; Liu, J. M. (1994b): Molecular, cellular and clinical aspects of parvovirus B19 infection. In: *Crit. Rev. Oncol. Hematol* 16 (1), S. 1–31.

- Bültmann, B. D.;** Klingel, K.; Sotlar, K.; Bock, C. T.; Baba, H. A.; Sauter, M.; Kandolf, R. (2003): Fatal parvovirus B19-associated myocarditis clinically mimicking ischemic heart disease: an endothelial cell-mediated disease. In: *Hum. Pathol* 34 (1), S. 92–95.
- Bültmann, B. D.;** Sotlar, K.; Klingel, K. (2004): Parvovirus B19. In: *N. Engl. J. Med* 350 (19), S. 2006-7; author reply 2006-7.
- Bundey, R. A.;** Insel, P. A. (2006): Adenylyl cyclase 6 overexpression decreases the permeability of endothelial monolayers via preferential enhancement of prostacyclin receptor function. In: *Mol. Pharmacol* 70 (5), S. 1700–1707.
- Buxade, M.;** Parra-Palau, J. L.; Proud, C. G. (2008): The Mnks: MAP kinase-interacting kinases (MAP kinase signal-integrating kinases). In: *Front. Biosci* 13, S. 5359–5373.
- Caillet-Fauquet, P.;** Perros, M.; Brandenburger, A.; Spegelaere, P.; Rommelaere, J. (1990): Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. In: *EMBO J* 9 (9), S. 2989–2995.
- Candotti, D.;** Etiz, N.; Parsyan, A.; Allain, J.-P. (2004): Identification and characterization of persistent human erythrovirus infection in blood donor samples. In: *J. Virol* 78 (22), S. 12169–12178.
- Cargnello, M.;** Roux, P. P. (2011): Activation and function of the MAPKs and their substrates, the MAPK-activated protein kinases. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 75 (1), S. 50–83.
- Carlet, M.;** Janjetovic, K.; Rainer, J.; Schmidt, S.; Panzer-Grümayer, R.; Mann, G. et al. (2010): Expression, regulation and function of phosphofructo-kinase/fructose-biphosphatases (PFKFBs) in glucocorticoid-induced apoptosis of acute lymphoblastic leukemia cells. In: *BMC Cancer* 10, S. 638.
- Cassinotti, P.;** Burtonboy, G.; Fopp, M.; Siegl, G. (1997): Evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in bone marrow. In: *J. Med. Virol* 53 (3), S. 229–232.
- Cassinotti, P.;** Siegl, G. (2000): Quantitative evidence for persistence of human parvovirus B19 DNA in an immunocompetent individual. In: *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis* 19 (11), S. 886–887.
- Cell signaling** (2012a): Cell Cycle G1. Online verfügbar unter http://www.cellsignal.com/reference/pathway/images/Cell_Cycle_G1S.jpg.
- Cell signaling** (2012b): Cell Cycle G2M DNA. Online verfügbar unter http://www.cellsignal.com/reference/pathway/images/Cell_Cycle_G2M_DNA.jpg.
- Chen, A. Y.;** Guan, W.; Lou, S.; Liu, Z.; Kleiboeker, S.; Qiu, J. (2010a): Role of erythropoietin receptor signaling in parvovirus B19 replication in human erythroid progenitor cells. In: *J. Virol* 84 (23), S. 12385–12396.
- Chen, A. Y.;** Zhang, E. Y.; Guan, W.; Cheng, F.; Kleiboeker, S.; Yankee, T. M.; Qiu, J. (2010b): The small 11 kDa nonstructural protein of human parvovirus B19 plays a key role in inducing apoptosis during B19 virus infection of primary erythroid progenitor cells. In: *Blood* 115 (5), S. 1070–1080.
- Chen, C.;** Chai, H.; Wang, X.; Lin, P. H.; Yao, Q. (2009a): Chlamydia heat shock protein 60 decreases expression of endothelial nitric oxide synthase in human and porcine coronary artery endothelial cells. In: *Cardiovasc. Res* 83 (4), S. 768–777.
- Chen, L.-L.;** Zhu, T. B.; Yin, H.; Huang, J.; Wang, L. S.; Cao, K. J.; Yang, Z. J. (2010c): Inhibition of MAPK signaling by eNOS gene transfer improves ventricular remodeling after myocardial infarction through reduction of inflammation. In: *Mol. Biol. Rep* 37 (7), S. 3067–3072.
- Chen, Z.;** Guan, W.; Cheng, F.; Chen, A. Y.; Qiu, J. (2009b): Molecular characterization of human parvovirus B19 genotypes 2 and 3. In: *Virology* 394 (2), S. 276–285.
- Cheriyath, V.;** Roy, A. L. (2000): Alternatively spliced isoforms of TFII-I. Complex formation, nuclear translocation, and differential gene regulation. In: *J. Biol. Chem* 275 (34), S. 26300–26308.
- Chia, J. K.;** Jackson, B. (1996): Myopericarditis due to parvovirus B19 in an adult. In: *Clin. Infect. Dis* 23 (1), S. 200–201.
- Chin, R.;** Earnest-Silveira, L.; Koeberlein, B.; Franz, S.; Zentgraf, H.; Bowden, S. et al. (2008): Failure of lamivudine to reverse hepatitis B virus-associated changes in ERK, Akt and cell cycle regulatory proteins. In: *Antivir. Ther. (Lond.)* 13 (2), S. 221–230.
- Chou, W.-L.;** Chuang, L.-M.; Chou, C.-C.; Wang, A. H.-J.; Lawson, J. A.; FitzGerald, G. A.; Chang, Z.-F. (2007): Identification of a novel prostaglandin reductase reveals the involvement of prostaglandin

E2 catabolism in regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activation. In: *J. Biol. Chem* 282 (25), S. 18162–18172.

Christensen, J.; Cotmore, S. F.; Tattersall, P. (1995): Minute virus of mice transcriptional activator protein NS1 binds directly to the transactivation region of the viral P38 promoter in a strictly ATP-dependent manner. In: *J. Virol* 69 (9), S. 5422–5430.

Christensen, J.; Cotmore, S. F.; Tattersall, P. (1997): A novel cellular site-specific DNA-binding protein cooperates with the viral NS1 polypeptide to initiate parvovirus DNA replication. In: *J. Virol* 71 (2), S. 1405–1416.

Christensen, J.; Tattersall, P. (2002): Parvovirus initiator protein NS1 and RPA coordinate replication fork progression in a reconstituted DNA replication system. In: *J. Virol* 76 (13), S. 6518–6531.

Cines, D. B.; Pollak, E. S.; Buck, C. A.; Loscalzo, J.; Zimmerman, G. A.; McEver, R. P. et al. (1998): Endothelial cells in physiology and in the pathophysiology of vascular disorders. In: *Blood* 91 (10), S. 3527–3561.

Cohen, B. J.; Gandhi, J.; Clewley, J. P. (2006): Genetic variants of parvovirus B19 identified in the United Kingdom: implications for diagnostic testing. In: *J. Clin. Virol* 36 (2), S. 152–155.

Contos, J. J.; Ishii, I.; Chun, J. (2000): Lysophosphatidic acid receptors. In: *Mol. Pharmacol* 58 (6), S. 1188–1196.

Corcioli, F.; Zakrzewska, K.; Rinieri, A.; Fanci, R.; Innocenti, M.; Civinini, R. et al. (2008): Tissue persistence of parvovirus B19 genotypes in asymptomatic persons. In: *J. Med. Virol* 80 (11), S. 2005–2011.

Corcoran, C.; Hardie, D.; Yeats, J.; Smuts, H. (2010): Genetic variants of human parvovirus B19 in South Africa: cocirculation of three genotypes and identification of a novel subtype of genotype 1. In: *J. Clin. Microbiol* 48 (1), S. 137–142.

Cossart, Y. E.; Field, A. M.; Cant, B.; Widdows, D. (1975): Parvovirus-like particles in human sera. In: *Lancet* 1 (7898), S. 72–73.

Cotmore, S. F.; McKie, V. C.; Anderson, L. J.; Astell, C. R.; Tattersall, P. (1986): Identification of the major structural and nonstructural proteins encoded by human parvovirus B19 and mapping of their genes by procaryotic expression of isolated genomic fragments. In: *J. Virol* 60 (2), S. 548–557.

Cotner-Gohara, E.; Kim, I.-K.; Tomkinson, A. E.; Ellenberger, T. (2008): Two DNA-binding and nick recognition modules in human DNA ligase III. In: *J. Biol. Chem* 283 (16), S. 10764–10772.

Coulombe, P.; Meloche, S. (2007): Atypical mitogen-activated protein kinases: structure, regulation and functions. In: *Biochim. Biophys. Acta* 1773 (8), S. 1376–1387.

Crooks, S. W.; Stockley, R. A. (1998): Leukotriene B4. In: *Int. J. Biochem. Cell Biol* 30 (2), S. 173–178.

Cuadrado, A.; Nebreda, A. R. (2010): Mechanisms and functions of p38 MAPK signalling. In: *Biochem. J* 429 (3), S. 403–417.

De Castro, E.: ViralZone: Dependovirus. Online verfügbar unter http://viralzone.expasy.org/all_by_species/226.html

Deacon, K.; Mistry, P.; Chernoff, J.; Blank, J. L.; Patel, R. (2003): p38 Mitogen-activated protein kinase mediates cell death and p21-activated kinase mediates cell survival during chemotherapeutic drug-induced mitotic arrest. In: *Mol. Biol. Cell* 14 (5), S. 2071–2087.

Dedio, J.; König, P.; Wohlfart, P.; Schroeder, C.; Kummer, W.; Müller-Esterl, W. (2001): NOSIP, a novel modulator of endothelial nitric oxide synthase activity. In: *FASEB J* 15 (1), S. 79–89.

Deiss, V.; Tratschin, J. D.; Weitz, M.; Siegl, G. (1990): Cloning of the human parvovirus B19 genome and structural analysis of its palindromic termini. In: *Virology* 175 (1), S. 247–254.

Deng, Y.; Zhang, M.; Riedel, H. (2008): Mitogenic roles of Gab1 and Grb10 as direct cellular partners in the regulation of MAP kinase signaling. In: *J. Cell. Biochem* 105 (5), S. 1172–1182.

Dennert, R.; Crijns, H. J.; Heymans, S. (2008): Acute viral myocarditis. In: *Eur. Heart J* 29 (17), S. 2073–2082.

Deroo, B. J. (2006): Estrogen receptors and human disease. In: *Journal of Clinical Investigation* 116 (3), S. 561–570.

- Dhanasekaran, D. N.;** Reddy, E. P. (2008): JNK signaling in apoptosis. In: *Oncogene* 27 (48), S. 6245–6251.
- Di Pasquale, G.;** Stacey, S. N. (1998): Adeno-associated virus Rep78 protein interacts with protein kinase A and its homolog PRKX and inhibits CREB-dependent transcriptional activation. In: *J. Virol* 72 (10), S. 7916–7925.
- Di Stefano, L.;** Jensen, M. R.; Helin, K. (2003): E2F7, a novel E2F featuring DP-independent repression of a subset of E2F-regulated genes. In: *EMBO J* 22 (23), S. 6289–6298.
- Doerig, C.;** Beard, P.; Hirt, B. (1987): A transcriptional promoter of the human parvovirus B19 active in vitro and in vivo. In: *Virology* 157 (2), S. 539–542.
- Doerig, C.;** Hirt, B.; Antonietti, J. P.; Beard, P. (1990): Nonstructural protein of parvoviruses B19 and minute virus of mice controls transcription. In: *J. Virol* 64 (1), S. 387–396.
- Dorsch, S.;** Liebisch, G.; Kaufmann, B.; Landenberg, P. von; Hoffmann, J. H.; Drobnik, W.; Modrow, S. (2002): The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A2-like activity. In: *J. Virol* 76 (4), S. 2014–2018.
- Dossumbekova, A.;** Berdyshev, E. V.; Gorshkova, I.; Shao, Z.; Li, C.; Long, P. et al. (2008): Akt activates NOS3 and separately restores barrier integrity in H₂O₂-stressed human cardiac microvascular endothelium. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 295 (6), S. H2417-26.
- Dudzinski, D. M.;** Igarashi, J.; Greif, D.; Michel, T. (2006): The regulation and pharmacology of endothelial nitric oxide synthase. In: *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol* 46, S. 235–276.
- Dudzinski, D. M.;** Michel, T. (2007): Life history of eNOS: partners and pathways. In: *Cardiovasc. Res* 75 (2), S. 247–260.
- Duechting, A.;** Tschöpe, C.; Kaiser, H.; Lamkemeyer, T.; Tanaka, N.; Aberle, S. et al. (2008): Human parvovirus B19 NS1 protein modulates inflammatory signaling by activation of STAT3/PIAS3 in human endothelial cells. In: *J. Virol* 82 (16), S. 7942–7952.
- Duechting, A.** (2008): Parvovirus B19-assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie: Interaktion des B19-NS1-Proteins mit der inflammatorischen Signaltransduktion. Online verfügbar unter <http://books.google.de/books?id=QJPatgAACAAJ&dq=inauthor:%22Anja+D%C3%BCchting%22&hl=d e&sa=X&ei=l4hjT8zvB4mo0QXzmuSnCA&ved=0CDIQ6AEwAA>
- Efimova, T.;** Broome, A.-M.; Eckert, R. L. (2003): A regulatory role for p38 delta MAPK in keratinocyte differentiation. Evidence for p38 delta-ERK1/2 complex formation. In: *J. Biol. Chem* 278 (36), S. 34277–34285.
- El-Rayes, B. F.;** LoRusso, P. M. (2004): Targeting the epidermal growth factor receptor. In: *Br. J. Cancer* 91 (3), S. 418–424.
- Enders, G.;** Dötsch, J.; Bauer, J.; Nützenadel, W.; Hengel, H.; Haffner, D. et al. (1998): Life-threatening parvovirus B19-associated myocarditis and cardiac transplantation as possible therapy: two case reports. In: *Clin. Infect. Dis* 26 (2), S. 355–358.
- Erdman, D. D.;** Durigon, E. L.; Wang, Q. Y.; Anderson, L. J. (1996): Genetic diversity of human parvovirus B19: sequence analysis of the VP1/VP2 gene from multiple isolates. In: *J. Gen. Virol* 77 (Pt 11), S. 2767–2774.
- Fields, B. N.;** Knipe, David M.; Howley, Peter M. (1996): *Fields virology*. 3. Aufl. Philadelphia: Lippincott-Raven Publishers.
- Fleming, I.;** Busse, R. (2003): Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. In: *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol* 284 (1), S. R1-12.
- Fontana, J.;** Fulton, D.; Chen, Y.; Fairchild, T. A.; McCabe, T. J.; Fujita, N. et al. (2002): Domain mapping studies reveal that the M domain of hsp90 serves as a molecular scaffold to regulate Akt-dependent phosphorylation of endothelial nitric oxide synthase and NO release. In: *Circ. Res* 90 (8), S. 866–873.
- Freshney, N. W.;** Rawlinson, L.; Guesdon, F.; Jones, E.; Cowley, S.; Hsuan, J.; Saklatvala, J. (1994): Interleukin-1 activates a novel protein kinase cascade that results in the phosphorylation of Hsp27. In: *Cell* 78 (6), S. 1039–1049.

- Fu, Y.;** Ishii, K. K.; Munakata, Y.; Saitoh, T.; Kaku, M.; Sasaki, T. (2002): Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. In: *J. Virol* 76 (11), S. 5395–5403.
- Fukada, K.;** Matumoto, K.; Takakura, F.; Yamaki, M.; Sato, H.; Okochi, K.; Maeda, Y. (2000): Four putative subtypes of human parvovirus B19 based on amino acid polymorphism in the C-terminal region of non-structural protein. In: *J. Med. Virol* 62 (1), S. 60–69.
- Funke, M.;** Zhao, Z.; Xu, Y.; Chun, J.; Tager, A. M. (2012): The lysophosphatidic acid receptor LPA1 promotes epithelial cell apoptosis after lung injury. In: *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol* 46 (3), S. 355–364.
- Gallinella, G.;** Venturoli, S.; Manaresi, E.; Musiani, M.; Zerbini, M. (2003): B19 virus genome diversity: epidemiological and clinical correlations. In: *J. Clin. Virol* 28 (1), S. 1–13.
- Giovannone, B.;** Lee, E.; Laviola, L.; Giorgino, F.; Cleveland, K. A.; Smith, R. J. (2003): Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. In: *J. Biol. Chem* 278 (34), S. 31564–31573.
- Goligorsky, M. S.;** Noiri, E.; Tsukahara, H.; Budzikowski, A. S.; Li, H. (2000): A pivotal role of nitric oxide in endothelial cell dysfunction. In: *Acta Physiol. Scand* 168 (1), S. 33–40.
- Gorbalenya, A. E.;** Koonin, E. V. (1989): Viral proteins containing the purine NTP-binding sequence pattern. In: *Nucleic Acids Res* 17 (21), S. 8413–8440.
- Gorbalenya, A. E.;** Koonin, E. V.; Wolf, Y. I. (1990): A new superfamily of putative NTP-binding domains encoded by genomes of small DNA and RNA viruses. In: *FEBS Lett* 262 (1), S. 145–148.
- Gossen, M.;** Freundlieb, S.; Bender, G.; Müller, G.; Hillen, W.; Bujard, H. (1995): Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. In: *Science* 268 (5218), S. 1766–1769.
- Guan, W.;** Cheng, F.; Huang, Q.; Kleiboeker, S.; Qiu, J. (2011): Inclusion of the central exon of parvovirus B19 precursor mRNA is determined by multiple splicing enhancers in both the exon and the downstream intron. In: *J. Virol* 85 (5), S. 2463–2468.
- Guan, W.;** Cheng, F.; Yoto, Y.; Kleiboeker, S.; Wong, S.; Zhi, N. et al. (2008): Block to the production of full-length B19 virus transcripts by internal polyadenylation is overcome by replication of the viral genome. In: *J. Virol* 82 (20), S. 9951–9963.
- Hale, K. K.;** Trollinger, D.; Rihaneck, M.; Manthey, C. L. (1999): Differential expression and activation of p38 mitogen-activated protein kinase alpha, beta, gamma, and delta in inflammatory cell lineages. In: *J. Immunol* 162 (7), S. 4246–4252.
- Han, J.;** Jiang, Y.; Li, Z.; Kravchenko, V. V.; Ulevitch, R. J. (1997): Activation of the transcription factor MEF2C by the MAP kinase p38 in inflammation. In: *Nature* 386 (6622), S. 296–299.
- Han, J.;** Tsukada, Y.-i.; Hara, E.; Kitamura, N.; Tanaka, T. (2005): Hepatocyte growth factor induces redistribution of p21(CIP1) and p27(KIP1) through ERK-dependent p16(INK4a) up-regulation, leading to cell cycle arrest at G1 in HepG2 hepatoma cells. In: *J. Biol. Chem* 280 (36), S. 31548–31556.
- Hayashi, J.** (2000): Hepatitis C Virus Core Protein Activates the MAPK/ERK Cascade Synergistically With Tumor Promoter TPA, But Not With Epidermal Growth Factor or Transforming Growth Factor α . In: *Hepatology* 32 (5), S. 958–961.
- Heegaard, E. D.;** Brown, K. E. (2002): Human parvovirus B19. In: *Clin. Microbiol. Rev* 15 (3), S. 485–505.
- Heegaard, E. D.;** Eiskjaer, H.; Baandrup, U.; Hornsleth, A. (1998): Parvovirus B19 infection associated with myocarditis following adult cardiac transplantation. In: *Scand. J. Infect. Dis* 30 (6), S. 607–610.
- Hemauer, A.;** Poblitzki, A. von; Gigler, A.; Cassinotti, P.; Siegl, G.; Wolf, H.; Modrow, S. (1996): Sequence variability among different parvovirus B19 isolates. In: *J. Gen. Virol* 77 (Pt 8), S. 1781–1785.
- Herrera, M.;** Hong, N. J.; Garvin, J. L. (2006): Aquaporin-1 transports NO across cell membranes. In: *Hypertension* 48 (1), S. 157–164.
- Hickman, A. B.;** Ronning, D. R.; Perez, Z. N.; Kotin, R. M.; Dyda, F. (2004): The nuclease domain of adeno-associated virus rep coordinates replication initiation using two distinct DNA recognition interfaces. In: *Mol. Cell* 13 (3), S. 403–414.

- Hilt, W.;** Wolf, D. H. (2004): The ubiquitin-proteasome system: past, present and future. In: *Cell. Mol. Life Sci* 61 (13), S. 1545.
- Hirasawa, K.;** Kim, A.; Han, H.-S.; Han, J.; Jun, H.-S.; Yoon, J.-W. (2003): Effect of p38 Mitogen-Activated Protein Kinase on the Replication of Encephalomyocarditis Virus. In: *Journal of Virology* 77 (10), S. 5649–5656.
- Ho, D.;** Yan, L.; Iwatsubo, K.; Vatner, D. E.; Vatner, S. F. (2010): Modulation of beta-adrenergic receptor signaling in heart failure and longevity: targeting adenylyl cyclase type 5. In: *Heart Fail Rev* 15 (5), S. 495–512.
- Hoelzer, K.;** Shackelton, L. A.; Parrish, C. R. (2008): Presence and role of cytosine methylation in DNA viruses of animals. In: *Nucleic Acids Res* 36 (9), S. 2825–2837.
- Hsu, T.-C.;** Wu, W.-J.; Chen, M.-C.; Tsay, G. J. (2004): Human parvovirus B19 non-structural protein (NS1) induces apoptosis through mitochondria cell death pathway in COS-7 cells. In: *Scand. J. Infect. Dis* 36 (8), S. 570–577.
- Hübschen, J. M.;** Mihneva, Z.; Mentis, A. F.; Schneider, F.; Aboudy, Y.; Grossman, Z. et al. (2009): Phylogenetic analysis of human parvovirus b19 sequences from eleven different countries confirms the predominance of genotype 1 and suggests the spread of genotype 3b. In: *J. Clin. Microbiol* 47 (11), S. 3735–3738.
- Ihalainen, T. O.;** Niskanen, E. A.; Jylhävä, J.; Turpeinen, T.; Rinne, J.; Timonen, J.; Vihinen-Ranta, M. (2007): Dynamics and interactions of parvoviral NS1 protein in the nucleus. In: *Cell. Microbiol* 9 (8), S. 1946–1959.
- International Committee on Taxonomy of Viruses:** ICTV Virus Taxonomy: 2009 Release. Online verfügbar unter <http://ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>
- Jackson, T. A.;** Taylor, H. E.; Sharma, D.; Desiderio, S.; Danoff, S. K. (2005): Vascular endothelial growth factor receptor-2: counter-regulation by the transcription factors, TFII-I and TFII-IRD1. In: *J. Biol. Chem* 280 (33), S. 29856–29863.
- Jagnandan, D.;** Sessa, W. C.; Fulton, D. (2005): Intracellular location regulates calcium-calmodulin-dependent activation of organelle-restricted eNOS. In: *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 289 (4), S. C1024–33.
- Jamiri** (2011): EPO Hämatopoese. Angriffspunkte von EPO während der Hämatopoese. Online verfügbar unter http://commons.wikimedia.org/wiki/File:EPO_H%C3%A4matopoese.png?uselang=de, zuletzt aktualisiert am 18.07.2011
- Jiang, Y.;** Chen, C.; Li, Z.; Guo, W.; Gegner, J. A.; Lin, S.; Han, J. (1996): Characterization of the structure and function of a new mitogen-activated protein kinase (p38beta). In: *J. Biol. Chem* 271 (30), S. 17920–17926.
- Jindal, H. K.;** Yong, C. B.; Wilson, G. M.; Tam, P.; Astell, C. R. (1994): Mutations in the NTP-binding motif of minute virus of mice (MVM) NS-1 protein uncouple ATPase and DNA helicase functions. In: *J. Biol. Chem* 269 (5), S. 3283–3289.
- Johnson, R. A.;** Huong, S. M.; Huang, E. S. (2000): Activation of the mitogen-activated protein kinase p38 by human cytomegalovirus infection through two distinct pathways: a novel mechanism for activation of p38. In: *J. Virol* 74 (3), S. 1158–1167.
- Jones, M. S.;** Kapoor, A.; Lukashov, V. V.; Simmonds, P.; Hecht, F.; Delwart, E. (2005): New DNA viruses identified in patients with acute viral infection syndrome. In: *J. Virol* 79 (13), S. 8230–8236.
- Justice, J. M.;** Tanner, M. A.; Myers, P. R. (2000): Endothelial cell regulation of nitric oxide production during hypoxia in coronary microvessels and epicardial arteries. In: *J. Cell. Physiol* 182 (3), S. 359–365.
- Kandolf, R.** (2004): Virusätiologie der inflammatorischen Kardiomyopathie. In: *Dtsch. Med. Wochenschr* 129 (41), S. 2187–2192.
- Kandolf, R.;** Bültmann, B.; Klingel, K.; Bock, C.-T. (2008): Molekulare Mechanismen und Konsequenzen kardialer Virusinfektionen. In: *Pathologie* 29 Suppl 2, S. 112–117.
- Karin, M.** (2006): Nuclear factor-kappaB in cancer development and progression. In: *Nature* 441 (7092), S. 431–436.

- Kaufmann, B.;** Simpson, A. A.; Rossmann, M. G. (2004): The structure of human parvovirus B19. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 101 (32), S. 11628–11633.
- Kawase, M.** Itoh K. Momoeda M. Young N. S. and Kajigaya S. (Hg.) (1995): Phosphorylation of B19 parvovirus nonstructural protein. Proceedings of the VIth Parvovirus Workshop. Montpellier, France.
- Kerr, A.** (2007): Fifth disease.jpg. Hg. v. Andrew Kerr. Online verfügbar unter http://de.wikipedia.org/w/index.php?title=Datei:Fifth_disease.jpg&filetimestamp=20070329021334
- Kerr, J. R.;** Barah, F.; Matthey, D. L.; Laing, I.; Hopkins, S. J.; Hutchinson, I. V.; Tyrrell, D. A. (2001): Circulating tumour necrosis factor-alpha and interferon-gamma are detectable during acute and convalescent parvovirus B19 infection and are associated with prolonged and chronic fatigue. In: *J. Gen. Virol* 82 (Pt 12), S. 3011–3019.
- Kerr, J. R.;** McCoy, M.; Burke, B.; Matthey, D. L.; Pravica, V.; Hutchinson, I. V. (2003): Cytokine gene polymorphisms associated with symptomatic parvovirus B19 infection. In: *J. Clin. Pathol* 56 (10), S. 725–727.
- Kerr, J. R.** (2006): Parvoviruses. London, New York: Hodder Arnold; Distributed in the U.S.A. by Oxford University Press.
- Kim, D. W.;** Cheriyaath, V.; Roy, A. L.; Cochran, B. H. (1998): TFII-I enhances activation of the c-fos promoter through interactions with upstream elements. In: *Mol. Cell. Biol* 18 (6), S. 3310–3320.
- Kim, D. W.;** Cochran, B. H. (2001): JAK2 activates TFII-I and regulates its interaction with extracellular signal-regulated kinase. In: *Mol. Cell. Biol* 21 (10), S. 3387–3397.
- Kimura, T.;** Imamura, K.; Matsumoto, M.; Wakasugi, H.; Ibayashi, H. (1980): Studies on serum immunoreactive elastase in experimental pancreatitis rats. I. In acute pancreatitis. In: *Gastroenterol. Jpn* 15 (6), S. 620–624.
- King, A. M.Q** (2012): Virus taxonomy. Classification and nomenclature of viruses: ninth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. London: Academic Press.
- Kivovich, V.;** Gilbert, L.; Vuento, M.; Naides, S. J. (2010): Parvovirus B19 genotype specific amino acid substitution in NS1 reduces the protein's cytotoxicity in culture. In: *Int J Med Sci* 7 (3), S. 110–119.
- Kivovich, V.;** Gilbert, L.; Vuento, M.; Naides, S. J. (2012): The putative metal coordination motif in the endonuclease domain of human Parvovirus B19 NS1 is critical for NS1 induced S phase arrest and DNA damage. In: *Int. J. Biol. Sci* 8 (1), S. 79–92.
- Klingel, K.;** Sauter, M.; Bock, C. T.; Szalay, G.; Schnorr, J.-J.; Kandolf, R. (2004): Molecular pathology of inflammatory cardiomyopathy. In: *Med. Microbiol. Immunol* 193 (2-3), S. 101–107.
- Komatsu, N.;** Yamamoto, M.; Fujita, H.; Miwa, A.; Hatake, K.; Endo, T. et al. (1993): Establishment and characterization of an erythropoietin-dependent subline, UT-7/Epo, derived from human leukemia cell line, UT-7. In: *Blood* 82 (2), S. 456–464.
- Kortenjann, M.;** Thomae, O.; Shaw, P. E. (1994): Inhibition of v-raf-dependent c-fos expression and transformation by a kinase-defective mutant of the mitogen-activated protein kinase Erk2. In: *Mol. Cell. Biol* 14 (7), S. 4815–4824.
- Lawen, A.** (2003): Apoptosis?an introduction. In: *Bioessays* 25 (9), S. 888–896.
- Lee, A. W.;** Sharp, E. R.; O'Mahony, A.; Rosenberg, M. G.; Israelski, D. M.; Nolan, G. P.; Nixon, D. F. (2008): Single-cell, phosphoepitope-specific analysis demonstrates cell type- and pathway-specific dysregulation of Jak/STAT and MAPK signaling associated with in vivo human immunodeficiency virus type 1 infection. In: *J. Virol* 82 (7), S. 3702–3712.
- Lee, J. C.;** Laydon, J. T.; McDonnell, P. C.; Gallagher, T. F.; Kumar, S.; Green, D. et al. (1994): A protein kinase involved in the regulation of inflammatory cytokine biosynthesis. In: *Nature* 372 (6508), S. 739–746.
- Lefrère, J.-J.;** Servant-Delmas, A.; Candotti, D.; Mariotti, M.; Thomas, I.; Brossard, Y. et al. (2005): Persistent B19 infection in immunocompetent individuals: implications for transfusion safety. In: *Blood* 106 (8), S. 2890–2895.
- Lewis, T. S.;** Shapiro, P. S.; Ahn, N. G. (1998): Signal transduction through MAP kinase cascades. In: *Adv. Cancer Res* 74, S. 49–139.

- Lin, C.-I.**; Chen, C.-N.; Huang, M.-T.; Lee, S.-J.; Lin, C.-H.; Chang, C.-C.; Lee, H. (2008): Lysophosphatidic acid upregulates vascular endothelial growth factor-C and tube formation in human endothelial cells through LPA(1/3), COX-2, and NF-kappaB activation- and EGFR transactivation-dependent mechanisms. In: *Cell. Signal* 20 (10), S. 1804–1814.
- Lin, C.-I.**; Chen, C.-N.; Lin, P.-W.; Chang, K.-J.; Hsieh, F.-J.; Lee, H. (2007a): Lysophosphatidic acid regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through LPA1 and LPA3. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 363 (4), S. 1001–1008.
- Lin, C.-I.**; Chen, C.-N.; Lin, P.-W.; Lee, H. (2007b): Sphingosine 1-phosphate regulates inflammation-related genes in human endothelial cells through S1P1 and S1P3. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 355 (4), S. 895–901.
- Liu, J. M.**; Green, S. W.; Shimada, T.; Young, N. S. (1992): A block in full-length transcript maturation in cells nonpermissive for B19 parvovirus. In: *J. Virol* 66 (8), S. 4686–4692.
- Lukashov, V. V.**; Goudsmit, J. (2001): Evolutionary relationships among parvoviruses: virus-host coevolution among autonomous primate parvoviruses and links between adeno-associated and avian parvoviruses. In: *J. Virol* 75 (6), S. 2729–2740.
- Lundqvist, A.**; Tolfvenstam, T.; Brytting, M.; Stolt, C. M.; Hedman, K.; Broliden, K. (1999): Prevalence of parvovirus B19 DNA in bone marrow of patients with haematological disorders. In: *Scand. J. Infect. Dis* 31 (2), S. 119–122.
- Luo, W.**; Astell, C. R. (1993): A novel protein encoded by small RNAs of parvovirus B19. In: *Virology* 195 (2), S. 448–455.
- Lupescu, A.**; Bock, C.-T.; Lang, P. A.; Aberle, S.; Kaiser, H.; Kandolf, R.; Lang, F. (2006): Phospholipase A2 activity-dependent stimulation of Ca²⁺ entry by human parvovirus B19 capsid protein VP1. In: *J. Virol* 80 (22), S. 11370–11380.
- Lupescu, A.**; Geiger, C.; Zahir, N.; Aberle, S.; Lang, P. A.; Kramer, S. et al. (2009): Inhibition of Na⁺/H⁺ exchanger activity by parvovirus B19 protein NS1. In: *Cell. Physiol. Biochem* 23 (1-3), S. 211–220.
- Macdonald, A.**; Harris, M. (2004): Hepatitis C virus NS5A: tales of a promiscuous protein. In: *J. Gen. Virol* 85 (Pt 9), S. 2485–2502.
- Maiti, D.**; Xu, Z.; Duh, E. J. (2008): Vascular endothelial growth factor induces MEF2C and MEF2-dependent activity in endothelial cells. In: *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci* 49 (8), S. 3640–3648.
- Malumbres, M.**; Pérez Castro, I. de; Hernández, M. I.; Jiménez, M.; Corral, T.; Pellicer, A. (2000): Cellular response to oncogenic ras involves induction of the Cdk4 and Cdk6 inhibitor p15(INK4b). In: *Mol. Cell. Biol* 20 (8), S. 2915–2925.
- Marais, R.**; Wynne, J.; Treisman, R. (1993): The SRF accessory protein Elk-1 contains a growth factor-regulated transcriptional activation domain. In: *Cell* 73 (2), S. 381–393.
- Marchini, G.**; Ståbi, B.; Kankes, K.; Lonne-Rahm, S.; Østergaard, M.; Nielsen, S. (2003): AQP1 and AQP3, psoriasin, and nitric oxide synthases 1-3 are inflammatory mediators in erythema toxicum neonatorum. In: *Pediatr Dermatol* 20 (5), S. 377–384.
- Mariggio, S.**; Sebastia, J.; Filippi, B. M.; Iurisci, C.; Volonté, C.; Amadio, S. et al. (2006): A novel pathway of cell growth regulation mediated by a PLA2alpha-derived phosphoinositide metabolite. In: *FASEB J* 20 (14), S. 2567–2569.
- Masada, N.**; Ciruela, A.; Macdougall, D. A.; Cooper, D. M. F. (2009): Distinct mechanisms of regulation by Ca²⁺/calmodulin of type 1 and 8 adenylyl cyclases support their different physiological roles. In: *J. Biol. Chem* 284 (7), S. 4451–4463.
- Meloche, S.**; Pouysségur, J. (2007): The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. In: *Oncogene* 26 (22), S. 3227–3239.
- Meng, W.**; Mushika, Y.; Ichii, T.; Takeichi, M. (2008): Anchorage of microtubule minus ends to adherens junctions regulates epithelial cell-cell contacts. In: *Cell* 135 (5), S. 948–959.
- Michel, J. B.**; Feron, O.; Sase, K.; Prabhakar, P.; Michel, T. (1997): Caveolin versus calmodulin. Counterbalancing allosteric modulators of endothelial nitric oxide synthase. In: *J. Biol. Chem* 272 (41), S. 25907–25912.

- Minshall**, R. D.; Sessa, W. C.; Stan, R. V.; Anderson, R. G. W.; Malik, A. B. (2003): Caveolin regulation of endothelial function. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 285 (6), S. L1179-83.
- Mitchell**, L. A. (2002): Parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein as a transactivator of interleukin-6 synthesis: common pathway in inflammatory sequelae of human parvovirus infections? In: *J. Med. Virol* 67 (2), S. 267–274.
- Modrow**, G. (2006): Parvovirus-B19-Infektion in der Schwangerschaft. Online verfügbar unter http://www.dvv-ev.de/fachausschuesse/de/virus_und_schwangerschaft/Parvovirus-B19inSchwangerschaft.pdf
- Moffatt**, S.; Tanaka, N.; Tada, K.; Nose, M.; Nakamura, M.; Muraoka, O. et al. (1996): A cytotoxic nonstructural protein, NS1, of human parvovirus B19 induces activation of interleukin-6 gene expression. In: *J. Virol* 70 (12), S. 8485–8491.
- Moffatt**, S.; Yaegashi, N.; Tada, K.; Tanaka, N.; Sugamura, K. (1998): Human parvovirus B19 nonstructural (NS1) protein induces apoptosis in erythroid lineage cells. In: *J. Virol* 72 (4), S. 3018–3028.
- Momoeda**, M.; Wong, S.; Kawase, M.; Young, N. S.; Kajigaya, S. (1994): A putative nucleoside triphosphate-binding domain in the nonstructural protein of B19 parvovirus is required for cytotoxicity. In: *J. Virol* 68 (12), S. 8443–8446.
- Morey**, A. L.; Ferguson, D. J.; Fleming, K. A. (1993): Ultrastructural features of fetal erythroid precursors infected with parvovirus B19 in vitro: evidence of cell death by apoptosis. In: *J. Pathol* 169 (2), S. 213–220.
- Morey**, A. L.; Ferguson, D. J.; Fleming, K. A. (1995): Combined immunocytochemistry and non-isotopic in situ hybridization for the ultrastructural investigation of human parvovirus B19 infection. In: *Histochem. J* 27 (1), S. 46–53.
- Morey**, A. L.; Keeling, J. W.; Porter, H. J.; Fleming, K. A. (1992): Clinical and histopathological features of parvovirus B19 infection in the human fetus. In: *Br J Obstet Gynaecol* 99 (7), S. 566–574.
- Morita**, E.; Nakashima, A.; Asao, H.; Sato, H.; Sugamura, K. (2003): Human parvovirus B19 nonstructural protein (NS1) induces cell cycle arrest at G(1) phase. In: *J. Virol* 77 (5), S. 2915–2921.
- Morita**, E.; Sugamura, K. (2002): Human parvovirus B19-induced cell cycle arrest and apoptosis. In: *Springer Semin. Immunopathol* 24 (2), S. 187–199.
- Morita**, E.; Tada, K.; Chisaka, H.; Asao, H.; Sato, H.; Yaegashi, N.; Sugamura, K. (2001): Human parvovirus B19 induces cell cycle arrest at G(2) phase with accumulation of mitotic cyclins. In: *J. Virol* 75 (16), S. 7555–7563.
- Mount**, P. F.; Kemp, B. E.; Power, D. A. (2007): Regulation of endothelial and myocardial NO synthesis by multi-site eNOS phosphorylation. In: *J. Mol. Cell. Cardiol* 42 (2), S. 271–279.
- Mülhardt**, Cornel (2006): *Der Experimentator: Molekularbiologie, Genomics*. 5. Aufl. München: Elsevier, Spektrum Akad. Verl.
- Munakata**, Y.; Saito-Ito, T.; Kumura-Ishii, K.; Huang, J.; Koderu, T.; Ishii, T. et al. (2005): Ku80 autoantigen as a cellular coreceptor for human parvovirus B19 infection. In: *Blood* 106 (10), S. 3449–3456.
- Munday**, D. C.; Surtees, R.; Emmott, E.; Dove, B. K.; Digard, P.; Barr, J. N. et al. (2012): Using SILAC and quantitative proteomics to investigate the interactions between viral and host proteomes. In: *Proteomics* 12 (4-5), S. 666–672.
- Murphy**, L. O.; Blenis, J. (2006): MAPK signal specificity: the right place at the right time. In: *Trends Biochem. Sci* 31 (5), S. 268–275.
- Naides** (1999): Infection with Parvovirus B19. In: *Curr Infect Dis Rep* 1 (3), S. 273–278.
- Nakashima**, A.; Morita, E.; Saito, S.; Sugamura, K. (2004): Human Parvovirus B19 nonstructural protein transactivates the p21/WAF1 through Sp1. In: *Virology* 329 (2), S. 493–504.
- Nguyen**, Q. T.; Wong, S.; Heegaard, E. D.; Brown, K. E. (2002): Identification and characterization of a second novel human erythrovirus variant, A6. In: *Virology* 301 (2), S. 374–380.

- Nigro, G.;** Bastianon, V.; Colloridi, V.; Ventriglia, F.; Gallo, P.; D'Amati, G. et al. (2000): Human parvovirus B19 infection in infancy associated with acute and chronic lymphocytic myocarditis and high cytokine levels: report of 3 cases and review. In: *Clin. Infect. Dis* 31 (1), S. 65–69.
- Nikkari, S.;** Roivainen, A.; Hannonen, P.; Möttönen, T.; Luukkainen, R.; Yli-Jama, T.; Toivanen, P. (1995): Persistence of parvovirus B19 in synovial fluid and bone marrow. In: *Ann. Rheum. Dis* 54 (7), S. 597–600.
- Norja, P.;** Eis-Hübinger, A. M.; Söderlund-Venermo, M.; Hedman, K.; Simmonds, P. (2008): Rapid sequence change and geographical spread of human parvovirus B19: comparison of B19 virus evolution in acute and persistent infections. In: *J. Virol* 82 (13), S. 6427–6433.
- Norja, P.;** Hokynar, K.; Aaltonen, L.-M.; Chen, R.; Ranki, A.; Partio, E. K. et al. (2006): Bioportfolio: lifelong persistence of variant and prototypic erythrovirus DNA genomes in human tissue. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 103 (19), S. 7450–7453.
- Nüesch, J. P. F.;** Rommelaere, J. (2006): NS1 interaction with CKII alpha: novel protein complex mediating parvovirus-induced cytotoxicity. In: *J. Virol* 80 (10), S. 4729–4739.
- Nüesch, J. P.;** Cotmore, S. F.; Tattersall, P. (1995): Sequence motifs in the replicator protein of parvovirus MVM essential for nicking and covalent attachment to the viral origin: identification of the linking tyrosine. In: *Virology* 209 (1), S. 122–135.
- Nüesch, J.P.** (2006): Regulation of non-structural protein functions by differential synthesis, modification and trafficking. In: (ed.) Kerr JR. et al. *Parvoviruses*. London: Edward Arnold Publishers Ltd. 2006:275-289
- Obata, T.;** Brown, G. E.; Yaffe, M. B. (2000): MAP kinase pathways activated by stress: the p38 MAPK pathway. In: *Crit. Care Med* 28 (4 Suppl), S. N67-77.
- Op Beeck, A. de;** Caillet-Fauquet, P. (1997): The NS1 protein of the autonomous parvovirus minute virus of mice blocks cellular DNA replication: a consequence of lesions to the chromatin? In: *J. Virol* 71 (7), S. 5323–5329.
- Op Beeck, A. de;** Sobczak-Thepot, J.; Sirma, H.; Bourgain, F.; Brechot, C.; Caillet-Fauquet, P. (2001): NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1). In: *J. Virol* 75 (22), S. 11071–11078.
- Ostrom, R. S.;** Bunday, R. A.; Insel, P. A. (2004): Nitric oxide inhibition of adenylyl cyclase type 6 activity is dependent upon lipid rafts and caveolin signaling complexes. In: *J. Biol. Chem* 279 (19), S. 19846–19853.
- Otani, H.** (2009): The role of nitric oxide in myocardial repair and remodeling. In: *Antioxid. Redox Signal* 11 (8), S. 1913–1928.
- Ozawa, K.;** Ayub, J.; Hao, Y. S.; Kurtzman, G.; Shimada, T.; Young, N. (1987): Novel transcription map for the B19 (human) pathogenic parvovirus. In: *J. Virol* 61 (8), S. 2395–2406.
- Ozawa, K.;** Ayub, J.; Kajigaya, S.; Shimada, T.; Young, N. (1988): The gene encoding the nonstructural protein of B19 (human) parvovirus may be lethal in transfected cells. In: *J. Virol* 62 (8), S. 2884–2889.
- Ozawa, K.;** Young, N. (1987): Characterization of capsid and noncapsid proteins of B19 parvovirus propagated in human erythroid bone marrow cell cultures. In: *J. Virol* 61 (8), S. 2627–2630.
- Ozawa, S.;** Ito, S.; Kato, Y.; Kubota, E.; Hata, R.-I. (2010): Human p38 delta MAP kinase mediates UV irradiation induced up-regulation of the gene expression of chemokine BRAK/CXCL14. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 396 (4), S. 1060–1064.
- Pallas, D. C.;** Shahrik, L. K.; Martin, B. L.; Jaspers, S.; Miller, T. B.; Brautigan, D. L.; Roberts, T. M. (1990): Polyoma small and middle T antigens and SV40 small t antigen form stable complexes with protein phosphatase 2A. In: *Cell* 60 (1), S. 167–176.
- Pallier, C.;** Greco, A.; Le Junter, J.; Saib, A.; Vassias, I.; Morinet, F. (1997): The 3' untranslated region of the B19 parvovirus capsid protein mRNAs inhibits its own mRNA translation in nonpermissive cells. In: *J. Virol* 71 (12), S. 9482–9489.
- Pankuweit, S.;** Maisch, B. (2010): Das Herz bei viralen Infektionen. In: *Internist (Berl)* 51 (7), S. 836–843.

- Pannicke, T.;** Wurm, A.; Iandiev, I.; Hollborn, M.; Linnertz, R.; Binder, D. K. et al. (2010): Deletion of aquaporin-4 renders retinal glial cells more susceptible to osmotic stress. In: *J. Neurosci. Res* 88 (13), S. 2877–2888.
- Panteva, M.;** Korkaya, H.; Jameel, S. (2003): Hepatitis viruses and the MAPK pathway: is this a survival strategy? In: *Virus Res* 92 (2), S. 131–140.
- Parsyan, A.;** Szmaragd, C.; Allain, J.-P.; Candotti, D. (2007): Identification and genetic diversity of two human parvovirus B19 genotype 3 subtypes. In: *J. Gen. Virol* 88 (Pt 2), S. 428–431.
- Peters, K.;** Unger, R. E.; Brunner, J.; Kirkpatrick, C. J. (2003): Molecular basis of endothelial dysfunction in sepsis. In: *Cardiovasc. Res* 60 (1), S. 49–57.
- Pintavorn, P.;** Ballermann, B. J. (1997): TGF-beta and the endothelium during immune injury. In: *Kidney Int* 51 (5), S. 1401–1412.
- Poole, B. D.;** Karetnyi, Y. V.; Naides, S. J. (2004): Parvovirus B19-induced apoptosis of hepatocytes. In: *J. Virol* 78 (14), S. 7775–7783.
- Poole, B. D.;** Kivovich, V.; Gilbert, L.; Naides, S. J. (2011): Parvovirus B19 nonstructural protein-induced damage of cellular DNA and resultant apoptosis. In: *Int J Med Sci* 8 (2), S. 88–96.
- Poole, B. D.;** Zhou, J.; Grote, A.; Schiftenbauer, A.; Naides, S. J. (2006): Apoptosis of liver-derived cells induced by parvovirus B19 nonstructural protein. In: *J. Virol* 80 (8), S. 4114–4121.
- Popik, W.;** Pitha, P. M. (1998): Early activation of mitogen-activated protein kinase kinase, extracellular signal-regulated kinase, p38 mitogen-activated protein kinase, and c-Jun N-terminal kinase in response to binding of simian immunodeficiency virus to Jurkat T cells expressing CCR5 receptor. In: *Virology* 252 (1), S. 210–217.
- Pott, C.;** Steinritz, D.; Bölck, B.; Mehlhorn, U.; Brixius, K.; Schwinger, R. H. G.; Bloch, W. (2006): eNOS translocation but not eNOS phosphorylation is dependent on intracellular Ca^{2+} in human atrial myocardium. In: *Am. J. Physiol., Cell Physiol* 290 (5), S. C1437-45.
- Pozzuto, T.;** Kietzell, K. von; Bock, T.; Schmidt-Lucke, C.; Poller, W.; Zobel, T. et al. (2011): Transactivation of human parvovirus B19 gene expression in endothelial cells by adenoviral helper functions. In: *Virology* 411 (1), S. 50–64.
- PREMIER Biosoft** (2012): Netprimer. Online verfügbar unter <http://www.premierbiosoft.com/servlet/com.pbi.crm.clientside.FreeToolLoginServlet>.
- Pujol, F. H.;** Navas, M.-C.; Hainaut, P.; Chemin, I. (2009): Worldwide genetic diversity of HBV genotypes and risk of hepatocellular carcinoma. In: *Cancer Lett* 286 (1), S. 80–88.
- Pumiglia, K. M.;** Decker, S. J. (1997): Cell cycle arrest mediated by the MEK/mitogen-activated protein kinase pathway. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 94 (2), S. 448–452.
- Qin, Y.;** Tang, X.; Garcia, T.; Hussain, M.; Zhang, J.; Lok, A. et al. (2011): Hepatitis B virus genotype C isolates with wild-type core promoter sequence replicate less efficiently than genotype B isolates but possess higher virion secretion capacity. In: *J. Virol* 85 (19), S. 10167–10177.
- Raab, U.;** Beckenlehner, K.; Lowin, T.; Niller, H.-H.; Doyle, S.; Modrow, S. (2002): NS1 protein of parvovirus B19 interacts directly with DNA sequences of the p6 promoter and with the cellular transcription factors Sp1/Sp3. In: *Virology* 293 (1), S. 86–93.
- Rapp, J. C.;** Krug, L. T.; Inoue, N.; Dambaugh, T. R.; Pellett, P. E. (2000): U94, the human herpesvirus 6 homolog of the parvovirus nonstructural gene, is highly conserved among isolates and is expressed at low mRNA levels as a spliced transcript. In: *Virology* 268 (2), S. 504–516.
- Reeves, M. B.;** Breidenstein, A.; Compton, T. (2012): Human cytomegalovirus activation of ERK and myeloid cell leukemia-1 protein correlates with survival of latently infected cells. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 109 (2), S. 588–593.
- Rinckel, L. A.;** Buno, B. R.; Gierman, T. M.; Lee, D. C. (2009): Discovery and analysis of a novel parvovirus B19 Genotype 3 isolate in the United States. In: *Transfusion* 49 (7), S. 1488–1492.
- Ripoli, M.;** Paziienza, V. (2011): Impact of HCV genetic differences on pathobiology of disease. In: *Expert Rev Anti Infect Ther* 9 (9), S. 747–759.
- Robert-Koch-Institut, R.** (1999): Epidemiologisches Bulletin 46/99 (46). Online verfügbar unter http://edoc.rki.de/documents/rki_fv/reLFCbM73iwS6/PDF/296OUm28vWVFM.pdf

- Rodis, J. F.;** Borgida, A. F.; Wilson, M.; Egan, J. F.; Leo, M. V.; Odibo, A. O.; Campbell, W. A. (1998): Management of parvovirus infection in pregnancy and outcomes of hydrops: a survey of members of the Society of Perinatal Obstetricians. In: *Am. J. Obstet. Gynecol* 179 (4), S. 985–988.
- Ronkina, N.;** Kotlyarov, A.; Gaestel, M. (2008): MK2 and MK3--a pair of isoenzymes? In: *Front. Biosci* 13, S. 5511–5521.
- Roovers, K.;** Assoian, R. K. (2000): Integrating the MAP kinase signal into the G1 phase cell cycle machinery. In: *Bioessays* 22 (9), S. 818–826.
- Ros, C.;** Kempf, C. (2004): The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. In: *Virology* 324 (2), S. 350–360.
- Rossmann, M. G.;** Moras, D.; Olsen, K. W. (1974): Chemical and biological evolution of nucleotide-binding protein. In: *Nature* 250 (463), S. 194–199.
- Rotola, A.;** Ravaioli, T.; Gonelli, A.; Dewhurst, S.; Cassai, E.; Di Luca, D. (1998): U94 of human herpesvirus 6 is expressed in latently infected peripheral blood mononuclear cells and blocks viral gene expression in transformed lymphocytes in culture. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 95 (23), S. 13911–13916.
- Rousseau, S.;** Houle, F.; Landry, J.; Huot, J. (1997): p38 MAP kinase activation by vascular endothelial growth factor mediates actin reorganization and cell migration in human endothelial cells. In: *Oncogene* 15 (18), S. 2169–2177.
- Roux, P. P.;** Blenis, J. (2004): ERK and p38 MAPK-activated protein kinases: a family of protein kinases with diverse biological functions. In: *Microbiol. Mol. Biol. Rev* 68 (2), S. 320–344.
- Rubinfeld, H.;** Seger, R. (2005): The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. In: *Mol. Biotechnol* 31 (2), S. 151–174.
- Ruppert, V.;** Meyer, T.; Balbach, A.; Richter, A.; Müller, H.-H.; Maisch, B.; Pankuweit, S. (2011): Genotype-specific effects on left ventricular function in parvovirus B19-positive patients with dilated cardiomyopathy. In: *J. Med. Virol* 83 (10), S. 1818–1825.
- SABiosciences** (2012): Pathway Central: eNOS Signaling. Online verfügbar unter http://www.sabiosciences.com/pathway.php?sn=eNOS_Signaling
- Saitou, N.;** Nei, M. (1987): The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. In: *Mol. Biol. Evol* 4 (4), S. 406–425.
- Sanabani, S.;** Neto, W. K.; Pereira, J.; Sabino, E. C. (2006): Sequence variability of human erythroviruses present in bone marrow of Brazilian patients with various parvovirus B19-related hematological symptoms. In: *J. Clin. Microbiol* 44 (2), S. 604–606.
- Sánchez, F. A.;** Savalia, N. B.; Durán, R. G.; Lal, B. K.; Boric, M. P.; Durán, W. N. (2006): Functional significance of differential eNOS translocation. In: *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol* 291 (3), S. H1058-64.
- Santamaría, E.;** Sánchez-Quiles, V.; Fernández-Irigoyen, J.; Corrales, F. (2012): Contribution of MS-Based Proteomics to the Understanding of Herpes Simplex Virus Type 1 Interaction with Host Cells. In: *Front Microbiol* 3, S. 107.
- Sasidharan, C. K.;** Sugathan, P.; Mampilly, N.; Agarwal, R.; Khare, S.; Lal, S.; Jayaram Paniker, C. K. (2009): Red baby syndrome a new disease due to parvovirus B-19 observed in Kerala. In: *Indian J Pediatr* 76 (3), S. 309–312.
- Schaeffer, H. J.;** Weber, M. J. (1999): Mitogen-activated protein kinases: specific messages from ubiquitous messengers. In: *Mol. Cell. Biol* 19 (4), S. 2435–2444.
- Schenk, T.;** Enders, M.; Pollak, S.; Hahn, R.; Huzly, D. (2009): High prevalence of human parvovirus B19 DNA in myocardial autopsy samples from subjects without myocarditis or dilative cardiomyopathy. In: *J. Clin. Microbiol* 47 (1), S. 106–110.
- Schilling, K.;** Opitz, N.; Wiesenthal, A.; Oess, S.; Tikkanen, R.; Müller-Esterl, W.; Icking, A. (2006): Translocation of endothelial nitric-oxide synthase involves a ternary complex with caveolin-1 and NOSTRIN. In: *Mol. Biol. Cell* 17 (9), S. 3870–3880.
- Schneider, B.;** Höne, A.; Tolba, R. H.; Fischer, H.-P.; Blümel, J.; Eis-Hübinger, A. M. (2008): Simultaneous persistence of multiple genome variants of human parvovirus B19. In: *J. Gen. Virol* 89 (Pt 1), S. 164–176.

- Schwarz**, T. F.; Gürtler, L. G.; Zoulek, G.; Deinhardt, F.; Roggendorf, M. (1989): Seroprevalence of human parvovirus B19 infection in Sao Tomé and Principe, Malawi and Mascarene Islands. In: *Zentralbl. Bakteriol* 271 (2), S. 231–236.
- Seddon**, M.; Shah, A. M.; Casadei, B. (2007): Cardiomyocytes as effectors of nitric oxide signalling. In: *Cardiovasc. Res* 75 (2), S. 315–326.
- Servant**, A.; Laperche, S.; Lallemand, F.; Marinho, V.; Saint Maur, G. de; Meritet, J. F.; Garbarg-Chenon, A. (2002): Genetic diversity within human erythroviruses: identification of three genotypes. In: *J. Virol* 76 (18), S. 9124–9134.
- Servant-Delmas**, A.; Laperche, S.; Mercier, M.; Lefrère, J.-J. (2009): Diversité génétique des Erythrovirus humains. Genetic diversity of human Erythroviruses. In: *Pathol. Biol* 57 (2), S. 167–174.
- Servant-Delmas**, A.; Lefrère, J.-J.; Morinet, F.; Pillet, S. (2010): Advances in human B19 erythrovirus biology. In: *J. Virol* 84 (19), S. 9658–9665.
- Shackelton**, L. A.; Parrish, C. R.; Truyen, U.; Holmes, E. C. (2005): High rate of viral evolution associated with the emergence of carnivore parvovirus. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 102 (2), S. 379–384.
- Shade**, R. O.; Blundell, M. C.; Cotmore, S. F.; Tattersall, P.; Astell, C. R. (1986): Nucleotide sequence and genome organization of human parvovirus B19 isolated from the serum of a child during aplastic crisis. In: *J. Virol* 58 (3), S. 921–936.
- Shen**, B. Q.; Lee, D. Y.; Zioncheck, T. F. (1999): Vascular endothelial growth factor governs endothelial nitric-oxide synthase expression via a KDR/Flk-1 receptor and a protein kinase C signaling pathway. In: *J. Biol. Chem* 274 (46), S. 33057–33063.
- Shibuya**, M. (2006): Vascular endothelial growth factor receptor-1 (VEGFR-1/Flt-1): a dual regulator for angiogenesis. In: *Angiogenesis* 9 (4), S. 225-30; discussion 231.
- Sigma-Aldrich**: FAQ EZview™ Red ANTI-FLAG M2 Affinity Gel. Online verfügbar unter http://sigma-aldrich.custhelp.com/app/answers/detail/a_id/397/p/51,111/session/L3RpbWUvMTM0MTY5ODAxMi9zaWQvYVE4Mk56Kms%3D
- Simmonds**, P. (2001): The origin and evolution of hepatitis viruses in humans. In: *J. Gen. Virol* 82 (Pt 4), S. 693–712.
- Siomi**, M. C.; Zhang, Y.; Siomi, H.; Dreyfuss, G. (1996): Specific sequences in the fragile X syndrome protein FMR1 and the FXR proteins mediate their binding to 60S ribosomal subunits and the interactions among them. In: *Mol. Cell. Biol* 16 (7), S. 3825–3832.
- Skaff**, P. T.; Labiner, D. M. (2001): Status epilepticus due to human parvovirus B19 encephalitis in an immunocompetent adult. In: *Neurology* 57 (7), S. 1336–1337.
- Skoura**, A.; Hla, T. (2009): Regulation of vascular physiology and pathology by the S1P2 receptor subtype. In: *Cardiovasc. Res* 82 (2), S. 221–228.
- Sol**, N.; Le Junter, J.; Vassias, I.; Freyssinier, J. M.; Thomas, A.; Prigent, A. F. et al. (1999): Possible interactions between the NS-1 protein and tumor necrosis factor alpha pathways in erythroid cell apoptosis induced by human parvovirus B19. In: *J. Virol* 73 (10), S. 8762–8770.
- Srivastava**, A.; Lu, L. (1988): Replication of B19 parvovirus in highly enriched hematopoietic progenitor cells from normal human bone marrow. In: *J. Virol* 62 (8), S. 3059–3063.
- Starr**, R.; Willson, T. A.; Viney, E. M.; Murray, L. J.; Rayner, J. R.; Jenkins, B. J. et al. (1997): A family of cytokine-inducible inhibitors of signalling. In: *Nature* 387 (6636), S. 917–921.
- Stepan**, H.; Faber, R. (2006): Elevated sFlt1 level and preeclampsia with parvovirus-induced hydrops. In: *N. Engl. J. Med* 354 (17), S. 1857–1858.
- Stracker**, T. H.; Cassell, G. D.; Ward, P.; Loo, Y.-M.; van Breukelen, B.; Carrington-Lawrence, S. D. et al. (2004): The Rep protein of adeno-associated virus type 2 interacts with single-stranded DNA-binding proteins that enhance viral replication. In: *J. Virol* 78 (1), S. 441–453.
- Sukhumsirichart**, W. A. P. B. V. & P. S. (2006): Complete nucleotide sequence and genomic organization of hepatopancreatic parvovirus (HPV) of *Penaeus monodon*. In: *Virology* 346 (2), S. 266–277.

- Suzuki, M.;** Yoto, Y.; Ishikawa, A.; Tsutsumi, H. (2009): Analysis of nucleotide sequences of human parvovirus B19 genome reveals two different modes of evolution, a gradual alteration and a sudden replacement: a retrospective study in Sapporo, Japan, from 1980 to 2008. In: *J. Virol* 83 (21), S. 10975–10980.
- Tai, S. C.;** Robb, G. B.; Marsden, P. A. (2004): Endothelial nitric oxide synthase: a new paradigm for gene regulation in the injured blood vessel. In: *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol* 24 (3), S. 405–412.
- Takahashi, T.;** Ozawa, K.; Takahashi, K.; Asano, S.; Takaku, F. (1990): Susceptibility of human erythropoietic cells to B19 parvovirus in vitro increases with differentiation. In: *Blood* 75 (3), S. 603–610.
- Tamanini, F.;** Kirkpatrick, L. L.; Schonkeren, J.; van Unen, L.; Bontekoe, C.; Bakker, C. et al. (2000): The fragile X-related proteins FXR1P and FXR2P contain a functional nucleolar-targeting signal equivalent to the HIV-1 regulatory proteins. In: *Hum. Mol. Genet* 9 (10), S. 1487–1493.
- Terpe, K.** (2003): Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. In: *Appl. Microbiol. Biotechnol* 60 (5), S. 523–533.
- Thomas, C. Y.;** Chouinard, M.; Cox, M.; Parsons, S.; Stallings-Mann, M.; Garcia, R. et al. (2003): Spontaneous activation and signaling by overexpressed epidermal growth factor receptors in glioblastoma cells. In: *Int. J. Cancer* 104 (1), S. 19–27.
- Thompson, J. D.;** Higgins, D. G.; Gibson, T. J. (1994): CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. In: *Nucleic Acids Res* 22 (22), S. 4673–4680.
- Thornton, T. M.;** Rincon, M. (2009): Non-classical p38 map kinase functions: cell cycle checkpoints and survival. In: *Int. J. Biol. Sci* 5 (1), S. 44–51.
- Toan, N. L.;** Duechting, A.; Kremsner, P. G.; Le Song, H.; Ebinger, M.; Aberle, S. et al. (2006a): Phylogenetic analysis of human parvovirus B19, indicating two subgroups of genotype 1 in Vietnamese patients. In: *J. Gen. Virol* 87 (Pt 10), S. 2941–2949.
- Toan, N. L.;** Le Song, H.; Kremsner, P. G.; Duy, D. N.; Binh, V. Q.; Koeberlein, B. et al. (2006b): Impact of the hepatitis B virus genotype and genotype mixtures on the course of liver disease in Vietnam. In: *Hepatology* 43 (6), S. 1375–1384.
- Traylen, C. M.;** Patel, H. R.; Fondaw, W.; Mahatme, S.; Williams, J. F.; Walker, L. R. et al. (2011): Virus reactivation: a panoramic view in human infections. In: *Future Virol* 6 (4), S. 451–463.
- Tremblay, P.-L.;** Auger, F. A.; Huot, J. (2006): Regulation of transendothelial migration of colon cancer cells by E-selectin-mediated activation of p38 and ERK MAP kinases. In: *Oncogene* 25 (50), S. 6563–6573.
- Trinkle-Mulcahy, L.** (2012): Resolving protein interactions and complexes by affinity purification followed by label-based quantitative mass spectrometry. In: *Proteomics*.
- Trinkle-Mulcahy, L.;** Boulon, S.; Lam, Y. W.; Urcia, R.; Boisvert, F.-M.; Vandermoere, F. et al. (2008): Identifying specific protein interaction partners using quantitative mass spectrometry and bead proteomes. In: *J. Cell Biol* 183 (2), S. 223–239.
- Tsai, P.-W.;** Shiah, S.-G.; Lin, M.-T.; Wu, C.-W.; Kuo, M.-L. (2003): Up-regulation of vascular endothelial growth factor C in breast cancer cells by heregulin-beta 1. A critical role of p38/nuclear factor-kappa B signaling pathway. In: *J. Biol. Chem* 278 (8), S. 5750–5759.
- Tschöpe, C.;** Bock, C.-T.; Kasner, M.; Noutsias, M.; Westermann, D.; Schwimmbeck, P.-L. et al. (2005): High prevalence of cardiac parvovirus B19 infection in patients with isolated left ventricular diastolic dysfunction. In: *Circulation* 111 (7), S. 879–886.
- Tsuda, H.;** Maeda, Y.; Nakagawa, K.; Nakayama, M.; Nishimura, H.; Ishihara, A.; Miyayama, H. (1994): Parvovirus B19-associated haemophagocytic syndrome with prominent neutrophilia. In: *Br. J. Haematol* 86 (2), S. 413–414.
- Tsukada, Y.;** Yokoyama, K.; Ishida, A.; Handa, M.; Mori, T.; Kizaki, M.; Okamoto, S. (2011): Erythroid crisis caused by parvovirus B19 transmitted via red blood cell transfusion. In: *Intern. Med* 50 (20), S. 2379–2382.

- Tzang**, B.-S.; Tsai, C.-C.; Chiu, C.-C.; Shi, J.-Y.; Hsu, T.-C. (2008): Up-regulation of adhesion molecule expression and induction of TNF-alpha on vascular endothelial cells by antibody against human parvovirus B19 VP1 unique region protein. In: *Clin. Chim. Acta* 395 (1-2), S. 77–83.
- Umene**, K.; Nunoue, T. (1990): The genome type of human parvovirus B19 strains isolated in Japan during 1981 differs from types detected in 1986 to 1987: a correlation between genome type and prevalence. In: *J. Gen. Virol* 71 (Pt 4), S. 983–986.
- Urlinger**, S.; Baron, U.; Thellmann, M.; Hasan, M. T.; Bujard, H.; Hillen, W. (2000): Exploring the sequence space for tetracycline-dependent transcriptional activators: novel mutations yield expanded range and sensitivity. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 97 (14), S. 7963–7968.
- Vassias**, I.; Hazan, U.; Michel, Y.; Sawa, C.; Handa, H.; Gouya, L.; Morinet, F. (1998): Regulation of human B19 parvovirus promoter expression by hGABP (E4TF1) transcription factor. In: *J. Biol. Chem* 273 (14), S. 8287–8293.
- Verkman**, A. S. (2002): Aquaporin water channels and endothelial cell function*. In: *J Anatomy* 200 (6), S. 617–627.
- Viard**, P.; Exner, T.; Maier, U.; Mironneau, J.; Nürnberg, B.; Macrez, N. (1999): Gbetagamma dimers stimulate vascular L-type Ca²⁺ channels via phosphoinositide 3-kinase. In: *FASEB J* 13 (6), S. 685–694.
- Vicente**, D.; Cilla, G.; Montes, M.; Pérez-Yarza, E. G.; Pérez-Trallero, E. (2007): Human bocavirus, a respiratory and enteric virus. In: *Emerging Infect. Dis* 13 (4), S. 636–637.
- Vihinen-Ranta**, M.; Suikkanen, S.; Parrish, C. R. (2004): Pathways of cell infection by parvoviruses and adeno-associated viruses. In: *J. Virol* 78 (13), S. 6709–6714.
- Walker**, J. E.; Saraste, M.; Runswick, M. J.; Gay, N. J. (1982): Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. In: *EMBO J* 1 (8), S. 945–951.
- Walker**, S. L.; Wonderling, R. S.; Owens, R. A. (1997): Mutational analysis of the adeno-associated virus type 2 Rep68 protein helicase motifs. In: *J. Virol* 71 (9), S. 6996–7004.
- Wan**, Z.; Zhi, N.; Wong, S.; Keyvanfar, K.; Liu, D.; Raghavachari, N. et al. (2010): Human parvovirus B19 causes cell cycle arrest of human erythroid progenitors via deregulation of the E2F family of transcription factors. In: *J. Clin. Invest* 120 (10), S. 3530–3544.
- Wang**, W. C. H.; Schillinger, R. M.; Malone, M. M.; Liggett, S. B. (2011): Paradoxical attenuation of β_2 -AR function in airway smooth muscle by Gi-mediated counterregulation in transgenic mice overexpressing type 5 adenylyl cyclase. In: *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol* 300 (3), S. L472-8.
- Wang**, Y.; Roche, O.; Xu, C.; Moriyama, E. H.; Heir, P.; Chung, J. et al. (2012): Hypoxia promotes ligand-independent EGF receptor signaling via hypoxia-inducible factor-mediated upregulation of caveolin-1. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 109 (13), S. 4892–4897.
- Ward**, P. A.; Hunninghake, G. W. (1998): Lung inflammation and fibrosis. In: *Am. J. Respir. Crit. Care Med* 157 (4 Pt 2), S. S123-9.
- Weigel-Kelley**, K. A.; Yoder, M. C.; Srivastava, A. (2001): Recombinant human parvovirus B19 vectors: erythrocyte P antigen is necessary but not sufficient for successful transduction of human hematopoietic cells. In: *J. Virol* 75 (9), S. 4110–4116.
- Weigel-Kelley**, K. A.; Yoder, M. C.; Srivastava, A. (2003): Alpha5beta1 integrin as a cellular coreceptor for human parvovirus B19: requirement of functional activation of beta1 integrin for viral entry. In: *Blood* 102 (12), S. 3927–3933.
- Westendorp**, B.; Mokry, M.; Groot Koerkamp, M. J. A.; Holstege, F. C. P.; Cuppen, E.; Bruin, A. de (2012): E2F7 represses a network of oscillating cell cycle genes to control S-phase progression. In: *Nucleic Acids Res* 40 (8), S. 3511–3523.
- Williams**, T. M.; Lisanti, M. P. (2004): The Caveolin genes: from cell biology to medicine. In: *Ann. Med* 36 (8), S. 584–595.
- Woolf**, A. D.; Champion, G. V.; Chishick, A.; Wise, S.; Cohen, B. J.; Klouda, P. T. et al. (1989): Clinical manifestations of human parvovirus B19 in adults. In: *Arch. Intern. Med* 149 (5), S. 1153–1156.
- Yaegashi**, N.; Niinuma, T.; Chisaka, H.; Uehara, S.; Moffatt, S.; Tada, K. et al. (1999): Parvovirus B19 infection induces apoptosis of erythroid cells in vitro and in vivo. In: *J. Infect* 39 (1), S. 68–76.

- Yoon, M.;** Smith, D. H.; Ward, P.; Medrano, F. J.; Aggarwal, A. K.; Linden, R. M. (2001): Amino-terminal domain exchange redirects origin-specific interactions of adeno-associated virus rep78 in vitro. In: *J. Virol* 75 (7), S. 3230–3239.
- Yoto, Y.;** Qiu, J.; Pintel, D. J. (2006): Identification and characterization of two internal cleavage and polyadenylation sites of parvovirus B19 RNA. In: *J. Virol* 80 (3), S. 1604–1609.
- Yusim, K.;** Kesmir, C.; Gaschen, B.; Addo, M. M.; Altfeld, M.; Brunak, S. et al. (2002): Clustering patterns of cytotoxic T-lymphocyte epitopes in human immunodeficiency virus type 1 (HIV-1) proteins reveal imprints of immune evasion on HIV-1 global variation. In: *J. Virol* 76 (17), S. 8757–8768.
- Zachos, G.;** Clements, B.; Conner, J. (1999): Herpes simplex virus type 1 infection stimulates p38/c-Jun N-terminal mitogen-activated protein kinase pathways and activates transcription factor AP-1. In: *J. Biol. Chem* 274 (8), S. 5097–5103.
- Zádori, Z.;** Szelei, J.; Lacoste, M. C.; Li, Y.; Gariépy, S.; Raymond, P. et al. (2001): A viral phospholipase A2 is required for parvovirus infectivity. In: *Dev. Cell* 1 (2), S. 291–302.
- Zhang, Z.;** Protzer, U.; Hu, Z.; Jacob, J.; Liang, T. J. (2004): Inhibition of cellular proteasome activities enhances hepadnavirus replication in an HBX-dependent manner. In: *J. Virol* 78 (9), S. 4566–4572.
- Zhao, Y.;** Wang, W.; Wang, Q.; Zhang, X.; Ye, L. (2012): Lipid metabolism enzyme 5-LOX and its metabolite LTB4 are capable of activating transcription factor NF- κ B in hepatoma cells. In: *Biochem. Biophys. Res. Commun* 418 (4), S. 647–651.
- Zhi, N.;** Zádori, Z.; Brown, K. E.; Tijssen, P. (2004): Construction and sequencing of an infectious clone of the human parvovirus B19. In: *Virology* 318 (1), S. 142–152.
- Zhi, N.;** Mills, I. P.; Lu, J.; Wong, S.; Filippone, C.; Brown, K. E. (2006): Molecular and functional analyses of a human parvovirus B19 infectious clone demonstrates essential roles for NS1, VP1, and the 11-kilodalton protein in virus replication and infectivity. In: *J. Virol* 80 (12), S. 5941–5950.
- Zhu, C.;** Qi, X.; Chen, Y.; Sun, B.; Dai, Y.; Gu, Y. (2011): PI3K/Akt and MAPK/ERK1/2 signaling pathways are involved in IGF-1-induced VEGF-C upregulation in breast cancer. In: *J. Cancer Res. Clin. Oncol* 137 (11), S. 1587–1594.
- Zhu, Z.;** Zheng, T.; Lee, C. G.; Homer, R. J.; Elias, J. A. (2002): Tetracycline-controlled transcriptional regulation systems: advances and application in transgenic animal modeling. In: *Semin. Cell Dev. Biol* 13 (2), S. 121–128.
- Zou, Y.;** Liu, Y.; Wu, X.; Shell, S. M. (2006): Functions of human replication protein A (RPA): from DNA replication to DNA damage and stress responses. In: *J. Cell. Physiol* 208 (2), S. 267–273.

6.6 Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Friederike Nora Utta
Anschrift	Untere Gerberstraße 7, 72764 Reutlingen
Telefon	0173/7805158
E-Mail	friederike.utta@gmx.de
Geburtsdatum, -ort	28. Juli 1981 in Reutlingen



Studium

Jan 2013 – Apr 2013	Vorbereitung auf die Verteidigung der Dissertation
Aug 2012 – Dez 2012	Weiterbildung „Integrierte Managementsysteme“ bei der TÜV SÜD Akademie
Jun 2008 – Aug 2012	Doktorarbeit zum Dr. rer. nat. in der Abteilung für Molekulare Pathologie, Institut für Pathologie und Neuropathologie, Uniklinikum Tübingen, Titel: „Parvovirus B19-assoziierte inflammatorische Kardiomyopathie: Dysregulation der inflammatorischen Signaltransduktion durch parvovirale Proteine“
Okt 2007 – März 2008	Geprüfte wissenschaftliche Hilfskraft am Zentrum für Regenerationsbiologie und regenerative Medizin Tübingen (ZRM) in Zusammenarbeit mit der Naturin GmbH, Weinheim
Jul 2006 - Okt 2007	Diplomarbeit im ZRM, Titel: „Untersuchungen zum Wnt-Signalweg in Epithelzellen der humanen Darmmucosa“, Note: 1,6
Nov 2004 - Dez 2004	Praktikum bei Multi Channel Systems, Reutlingen, Mikroelectronic Arrays
Okt 2001 – Okt 2007	Studiengang Biologie Diplom (Note: sehr gut), Eberhard Karls Universität Tübingen

Schulbildung

Sep 1992 – Jun 2001	Albert Einstein Gymnasium Reutlingen. Abschluss: Allgemeine Hochschulreife.
Sep 1988 – Jul 1992	Mörrike-Grundschule Reutlingen-Sondelfingen

6.7 Publikationen

Begutachtete

Kongressbeiträge:

79. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 03.-06.04.2013:

- 1) „*Impact of Human Parvovirus B19-Mutants on Myocarditis and dilated Cardiomyopathy*“; C.-T. Bock, **F. Utta**, E.C. Brunner, K. Klingel, R. Kandolf; **DGK-prämiert**

78. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 11. - 14.04.2012:

- 2) „*Interaktion des Parvovirus B19 NS1-Proteins mit dem inflammatorischen Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK) Signalweg in humanen Endothelzellen*“; **F. Utta**, E. Fein, S. Simonovic, R. Mammato, R. Kandolf, C.-T. Bock

- 3) „*Inhibition der Parvovirus B19-Replikation durch B19V-shRNA Interferenz bei der B19V-assoziierten inflammatorischen Kardiomyopathie*“; A. Kirste, M. Brandt, S. Simonovic, **F. Utta**, E. Fein, R. Mammato, J.Kurreck, H. Fechner, R. Kandolf, C.-T. Bock

76. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 08. - 10.04.2010:

- 4) „*Characterization of the human Parvovirus B19-Minichromosome: control mechanisms of B19V replication in human endothelial cells*“; S. Simonovic, **F. Utta**, R. Mammato, A. Kirste, R. Kandolf, T. Bock

75. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Kardiologie, Mannheim, 16. - 18.04.2009:

- 5) „*Parvovirus B19 (B19V)-associated Inflammatory Cardiomyopathy: Inhibition of B19V replication by adenovector-derived short hairpin RNA*“; M. Brandt, J. Kurreck, H. Fechner, S. Simonovic, **F. Utta**, R. Kandolf, T. Bock

Veröffentlichte

Sequenzen:

Entrez Nucleotide database (NCBI-NIH)

- 1) HQ340602 Human parvovirus B19 NS1 and VP1/2 genes, complete cds
- 2) HQ340601 Human parvovirus B19 NS1 and VP1/2 genes, complete cds
- 3) JN638517 Human parvovirus B19 isolate 2a 1 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 4) JN638519 Human parvovirus B19 isolate 2a 3 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 5) JN638521 Human parvovirus B19 isolate 2a 6 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds

- 6) JN638523 Human parvovirus B19 isolate 2a 8 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 7) JN638525 Human parvovirus B19 isolate 2a 14 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 8) JN638527 Human parvovirus B19 isolate 2a 16 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 9) JN638529 Human parvovirus B19 isolate 2a 20 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 10) JN638531 Human parvovirus B19 isolate 2a 22 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 11) JN638533 Human parvovirus B19 isolate 2b 1 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 12) JN638535 Human parvovirus B19 isolate 2b 3 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 13) JN638537 Human parvovirus B19 isolate 2b 5 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 14) JN638539 Human parvovirus B19 isolate 2b 7 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 15) JN638541 Human parvovirus B19 isolate 2b 9 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 16) JN638543 Human parvovirus B19 isolate 2b 26 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 17) JN638545 Human parvovirus B19 isolate 2b 28 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 18) JN638547 Synthetic construct tagged nonstructural protein 1 and neomycin/kanamycin resistance protein genes, complete cds
- 19) JN638518 Human parvovirus B19 isolate 2a 2 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 20) JN638520 Human parvovirus B19 isolate 2a 5 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 21) JN638522 Human parvovirus B19 isolate 2a 7 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 22) JN638524 Human parvovirus B19 isolate 2a 9 nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds

- 23)** JN638526 Human parvovirus B19 isolate 2a 15
nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 24)** JN638528 Human parvovirus B19 isolate 2a 18
nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 25)** JN638530 Human parvovirus B19 isolate 2a 21
nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 26)** JN638532 Human parvovirus B19 isolate 2a 23
nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 27)** JN638534 Human parvovirus B19 isolate 2b 2 nonstructural
protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 28)** JN638536 Human parvovirus B19 isolate 2b 4 nonstructural
protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 29)** JN638538 Human parvovirus B19 isolate 2b 6 nonstructural
protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 30)** JN638540 Human parvovirus B19 isolate 2b 8 nonstructural
protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 31)** JN638542 Human parvovirus B19 isolate 2b 25
nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 32)** JN638544 Human parvovirus B19 isolate 2b 27
nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 33)** JN638546 Human parvovirus B19 isolate 2b 29
nonstructural protein 1 (NS1) gene, partial cds
- 34)** JQ302818 Expression vector pcDNA-NS1-FLAG, complete
genome

Im Selbstverlag herausgegeben von:

Friederike Utta
Untere Gerberstraße 7
72764 Reutlingen
