

INAUGURAL-DISSERTATION

zur
Erlangung der Doktorwürde
der
Naturwissenschaftlich-Mathematischen Gesamtfakultät
der
Ruprecht-Karls-Universität
Heidelberg

vorgelegt von

Diplom Humanbiologin
Julia Peters
aus Greifswald

Tag der mündlichen Prüfung:

Phospholipase A₂
in der
Parvovirus MVMp induzierten Zellyse

Gutachter: PD Dr. Jürgen Kleinschmidt
PD Dr. Gabriele Petersen

Danksagung

Prof. Jean Rommelaere danke ich dafür, dass ich die Möglichkeit bekam, meine Doktorarbeit in der Abteilung Infektion und Krebs (F010) und INSERM *Unité* 375 des DKFZ Heidelberg anzufertigen.

PD Dr. Jürgen Kleinschmidt und PD Dr. Gabriele Petersen danke ich, dass sie sich zur Begutachtung meiner Arbeit bereiterklärt haben. Ganz besonders Jürgen Kleinschmidt danke ich auch für das stets große Interesse an meinem Projekt und seine Diskussionsbereitschaft, die mir eine große Hilfe war.

Laurent Daeffler danke ich für die wissenschaftliche Zusammenarbeit. Auch den anderen Kollegen des Labors 2.208, insbesondere Rita Hörlein und Zahari Raykov, danke ich für die nette Arbeitsumgebung.

Die PLA₂-Spezialisten PD Dr. Marietta Kaszkin (Universität Frankfurt / Main), Dr. Gerard Lambeau (Universität Valbonne, Frankreich) sowie Dr. Michael Gelb (Universität of Washington, USA) haben nicht nur durch die unkomplizierte Bereitstellung wichtiger experimenteller Voraussetzungen, sondern auch durch die offene und kompetente Diskussion des Projektes große Hilfe geleistet und meiner Arbeit wichtige Impulse vermittelt.

Ein ganz herzliches Dankeschön gilt Celina Cziepluch, die mir durch ihre Hilfsbereitschaft in der Korrektur und Diskussion dieser Arbeit eine große Unterstützung war.

Auch Tim Waterboer, Jan Cornelis und Marietta Kaszkin danke ich sehr für die kritische Auseinandersetzung mit der Ihnen mehr oder weniger unvertrauten Thematik, für die wissenschaftliche Diskussion und das gründliche Lesen einzelner Teile der vorliegenden Arbeit.

Ein ganz großes Dankeschön gebührt Ute Koch und Barbara Leuchs. Ihr habt nicht nur bei *Thanapon`s*, zwischen den Heidelberger Kleingärten, im DRK Raum oder in der Weststadt so manchen meiner Tage gerettet.

Herrn Goran Svigir aus dem ZPP Heidelberg danke ich für die unzähligen Freitagabende, seine Hilfe und das Teilhaben an meinem Leben.

Meinem lieben Hendrik danke ich für die geduldige und sorgfältige Zerpflückung erster Arbeitsentwürfe. Doch noch viel mehr danke ich Ihm für seine ununterbrochene, verständnisvolle Unterstützung, die tägliche Motivation und vor allem unseren großen gemeinsamen Traum!

Sowohl diese Arbeit als auch all das, was ihr und meiner Zeit in Heidelberg vorausging, wäre nicht möglich gewesen, hätte ich nicht immer auf eine großartige Familie vertrauen und bauen können. Vor allem meinen lieben Eltern, wie auch meiner allerbesten Freundin und zugleich Schwester danke ich für die Unterstützung in allen Lebenslagen, das Entgegenkommen, die vielen offenen Ohren und insbesondere ihr ganz großes Herz.

Zusammenfassung

Das autonome Parvovirus *Minute Virus of Mice* MVMp ist ein onkolytisches Virus, da es selektiv neoplastisch transformierte Zellen infiziert und tötet. Während viele zytotoxische Effekte, die eine MVMp Infektion hervorruft, auf Aktivitäten des viralen NS1 Proteins zurückgeführt wurden, sind die Ursachen der MVMp induzierten Wirtszelllyse und ihr Mechanismus bisher unklar. Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, virale und zelluläre Faktoren der MVMp induzierten Zelllyse zu identifizieren. Es wurde vermutet, dass Phospholipase A₂ (PLA₂) Enzyme, die in sekretorische sPLA₂, zytosolische cPLA₂ und Ca²⁺-unabhängige iPLA₂ unterteilt werden, aus den folgenden Gründen für diesen Zusammenhang von Bedeutung sein könnten. Zum einen sind sie als Phospholipidhydrolasen, neben der Produktion von Lipidsignalmediatoren, auch als wichtige Effektoren schwerwiegender Membranveränderungen in der Zelle bekannt. Zum anderen verfügt das parvovirale Kapsidprotein VP1 im N-terminalen Bereich selbst über ein PLA₂ Motiv.

Die in dieser Arbeit erzielten Ergebnisse zeigten, dass die N-terminale Domäne von VP1 einen essentiellen Beitrag zur MVMp induzierten Zelllyse leistet. Rekombinante MVMp Viren, die für den N-terminalen VP1 Bereich kodierten, wiesen im Vergleich zu Viren, die ausschließlich die NS Proteine exprimierten, eine stark erhöhte lytische Aktivität auf. Experimente mit rekombinanten Viren, die eine inaktivierende Mutation in der katalytischen Domäne dieses PLA₂ Motivs enthielten, ließen jedoch darauf schließen, dass der Beitrag dieses Motivs zur Zelllyse nicht in seiner enzymatischen Aktivität begründet ist. Dieses Ergebnis ließ als Ursache für die beobachtete massive Freisetzung von Arachidonsäure (AA) nach der MVMp Infektion, eine Aktivität zellulärer PLA₂ vermuten. AA ist ein gängiges Produkt der PLA₂ katalysierten Phospholipidhydrolyse und konnte, korrelierend mit der virusinduzierten Zelllyse, im Kulturüberstand infizierter Zellen detektiert werden. Dass es sich hierbei nicht um einen Nebeneffekt der Zelllyse, sondern einen enzymatisch regulierten Prozess in den noch intakten Zellen handelte, konnte durch den Nachweis einer virusinduzierten, starken Freisetzung von Prostaglandin E₂, einem Produkt des AA Metabolismus, bekräftigt werden. In anschließenden Experimenten konnte unter Verwendung etablierter selektiver PLA₂ Inhibitoren sowohl die virusinduzierte AA-Freisetzung als auch die Zelllyse gehemmt werden. Die genaue Untersuchung im Hinblick auf die Aktivierung dieser Enzyme ergab, dass cPLA₂ infolge der MVMp Infektion an einer für die katalytische Aktivität essentiellen Phosphorylierungsstelle phosphoryliert wird und an intrazellulären Membrankompartimenten akkumuliert. Der Nachweis einer Aktivierung von p38 und p44/42 MAPK, einem der cPLA₂ Phosphorylierung vorgeschalteten Ereignis, bestätigte dieses Ergebnis. Während ein Beitrag zellulärer iPLA₂ ausgeschlossen wurde, konnte die Bedeutung zellulärer sekretorischer sPLA₂ hingegen nicht vollständig klargestellt werden. Basierend auf den hier gezeigten Ergebnissen muss davon ausgegangen werden, dass die MVMp Infektion keine Sekretion des Enzyms hervorruft. Eine intrazelluläre Funktion einzelner sPLA₂ Subtypen konnte allerdings nicht ausgeschlossen werden. Des Weiteren

geben Untersuchungen mit einem in den NS Proteinen mutierten, hypolytischen MVMP Virus Hinweise darauf, dass auch die viralen NS Proteine eine wichtige Rolle in der MVMP induzierten Zelllyse spielen, da die bei einer wildtyp MVMP Infektion nachgewiesene Stimulation der MAPK und Aktivierung der cPLA₂ bei einer Infektion mit diesem Virus ausbleiben.

In der vorliegenden Arbeit wurde erstmalig gezeigt, dass cPLA₂ Enzyme, als zelluläre Faktoren, und die N-terminale Domäne des VP1 Proteins, als viraler Faktor, erheblich zur Parvovirus MVMP induzierten Zelllyse beitragen.

Summary

The autonomous parvovirus *Minute Virus of Mice* (MVMp) is an oncolytic virus that selectively infects and finally kills neoplastic transformed cells. Several cytotoxic effects induced by MVMp infections are attributed mostly to activities of the viral NS1 protein. However, the cause of MVMp induced cell lysis and its mechanism are not known yet. Therefore, the aim of this work was to identify further viral and cellular factors involved in the lytic process. Phospholipase A₂ (PLA₂) enzymes, which are divided in secretory sPLA₂, cytosolic cPLA₂, and Ca²⁺ independent iPLA₂, appeared to be promising candidates. On the one hand, PLA₂ enzymes catalyze the hydrolysis of phospholipids and are therefore involved in both the production of signal transducers and severe changes in cellular membranes. On the other hand, the parvoviral capsid protein VP1 contains a PLA₂ motif itself in its N-terminal domain. Indeed, it is shown here for the first time that the N-terminal domain of the viral VP1 protein is essentially contributing to MVMp induced cell lysis. Recombinant MVMp viruses encoding the N-terminal VP1 domain exhibited a strongly enhanced lytic activity compared to viruses encoding only the viral NS proteins. However experiments with recombinant viruses containing an inactivating mutation in the catalytic domain of the PLA₂ motif provided evidence that the contribution of this domain to cell lysis is not based on its enzymatic activity. Thus, it was assumed, that the substantial release of Arachidonic acid (AA) after MVMp infection is caused by cellular PLA₂. AA is a prevalent product of phospholipid hydrolysis by PLA₂. In correlation with induction of cell lysis, AA could be detected in the culture supernatant of infected cells. This was not a mere side effect of cell lysis, but due to an enzymatically regulated process still in the intact cell, as was confirmed by demonstrating a virus induced, strong release of Prostaglandine E₂, a product of the AA metabolism. In further experiments MVMp induced AA release as well as cell lysis could be strongly reduced by the application of established selective inhibitors of cellular cPLA₂. Investigations on the activation of these cellular enzymes actually showed that cPLA₂ became phosphorylated at a specific phosphorylation site known to be essential for the catalytic activity of the enzyme. As one more sign of activation, cPLA₂ translocated from the cytoplasm to perinuclear, membraneous compartments in the cell. p38 and p44/42 MAPK activation, an essential upstream event of cPLA₂ phosphorylation, was proven and confirmed this result. While a role of cellular iPLA₂ in MVMp induced cell lysis was ruled out, the role of cellular sPLA₂ is still not completely clear. Based on the results of various experimental trials, sPLA₂ is probably not secreted upon MVMp infection. However, an intracellular function of particular sPLA₂ subtypes could not be excluded. Furthermore, using a hypolytic MVMp virus, mutated in the NS coding region, indicates that also the viral NS proteins play an important role in MVMp induced cell lysis, since an infection with this virus does not result in MAPK stimulation and cPLA₂ phosphorylation.

The on hand study is demonstrating the first time that cPLA₂ enzymes, as cellular factors and the N-terminal domain of the viral VP1 proteins, as viral factors, have a striking impact on MVMp induced cell lysis.

Inhaltsverzeichnis

Zusammenfassung	1
Summary	3
Inhaltsverzeichnis	4
Abbildungsverzeichnis	9
Abkürzungsverzeichnis	12
Anmerkungen	15
1. Einleitung	16
1.1 Autonome Parvoviren	16
1.1.1 Taxonomie	16
1.2 <i>Minute Virus of Mice</i> (MVM)	18
1.2.1 Das parvovirale Genom	19
1.2.2 Die parvoviralen Proteine	21
1.2.2.1 Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1)	21
1.2.2.2 Das Nichtstrukturprotein 2 (NS2)	23
1.2.2.3 Die Kapsidproteine	24
1.2.3 Der Aufbau parvoviraler Partikel	25
1.2.4 Der parvovirale Infektionszyklus	26
1.3 Onkotropismus und Onkosuppression	29
1.3.1 MVMp vermittelte Zytotoxizität	31
1.4 Die Superfamilie der Phospholipasen A ₂	33
1.4.1 Sekretorische PLA ₂ (sPLA ₂)	36
1.4.2 Zytosolische PLA ₂ (cPLA ₂)	41
1.4.3 Ca ²⁺ -unabhängige PLA ₂ (iPLA ₂)	45
1.4.4 Über die Bedeutung zellulärer PLA ₂ in Zellschädigungen und Zelltod	46
1.5 Zielsetzung der Arbeit	49
2. Materialien und Methoden	51
2.1 Materialien	51
2.1.1 Zelllinien	51
2.1.2 Virusstämme	51
2.1.3 Bakterienstämme	52

2.1.4	Plasmide.....	52
2.1.5	DNA-Oligonukleotide	52
2.1.5.1	Oligonukleotide zur sPLA ₂ -Subtypisierung	53
2.1.6	Kulturmedien und Zusätze.....	54
2.1.6.1	Zellkulturmedien und Zusätze	54
2.1.6.2	<i>E. coli</i> -Medien und Zusätze.....	54
2.1.7	Enzyme.....	54
2.1.8	Antikörper	55
2.1.8.1	Primärantikörper.....	55
2.1.8.2	Sekundärantikörper.....	56
2.1.8.2.1	Sekundärantikörper für Western Blot	56
2.1.8.2.2	Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbung	56
2.1.9	Radioaktives Material	56
2.1.10	Rekombinante Proteine	56
2.1.11	Größenstandards.....	57
2.1.11.1	DNA-Längenstandards.....	57
2.1.11.2	Protein-Molekulargewichtstandards	57
2.1.12	Reagenziensätze (<i>Kits</i>)	57
2.1.13	Chemikalien.....	58
2.1.13.1	Spezielle Chemikalien.....	58
2.1.13.2	Sonstige Chemikalien und Materialien.....	58
2.1.14	Spezielle Geräte	60
2.2	Methoden.....	61
2.2.1	Zellbiologische Methoden.....	61
2.2.1.1	Kultivierung von Säugerzellen.....	61
2.2.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen.....	61
2.2.1.3	Bestimmung der Zellzahl.....	62
2.2.1.4	Synchronisation von Säugetierzellen durch Serumentzug.....	62
2.2.1.5	Transfektion von Plasmid DNA in Säugetierzellen nach der CaPO ₄ - Methode	62
2.2.1.6	Kultivierung von Säugetierzellen auf Objektträgern	63
2.2.1.7	Methoden zur Bestimmung zytopathischer Effekte.....	63
2.2.1.7.1	LDH-Test.....	63
2.2.1.7.2	MTT-Test.....	63
2.2.1.8	Bestimmung von sPLA ₂ Aktivität in Zellkulturüberständen.....	64
2.2.1.9	<i>In vivo</i> [³ H]-AA Markierung von Zellmembranen	64
2.2.1.10	Bestimmung von [³ H]-AA-Freisetzung.....	65

2.2.1.11	Bestimmung von PGE ₂ -Freisetzung.....	65
2.2.2	Virologische Methoden	65
2.2.2.1	Produktion rekombinanter Viren durch Kotransfektion in 293T Zellen ...	65
2.2.2.2	Aufreinigung und Konzentration von Viren im Iodixanolgradienten	66
2.2.2.3	Virusinfektion von Säugerzellen.....	67
2.2.2.4	Quantifizierung von Virusstocks.....	68
2.2.2.4.1	Plaque-Assay	68
2.2.2.4.2	Filterhybridisierungs-Assay	69
2.2.3	Mikrobiologische Methoden.....	70
2.2.3.1	Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen	70
2.2.3.2	Herstellung elektrokompenter Bakterien	70
2.2.3.3	Transformation von <i>E. coli</i> Bakterien mit Plasmid-DNA durch Elektroporation	71
2.2.3.4	Selektion bakterieller Kolonien durch α -Komplementation (Blau-weiß Selektion)	71
2.2.4	Molekularbiologische Methoden	72
2.2.4.1	Präparation von Plasmid-DNA aus <i>E. coli</i>	72
2.2.4.2	Photometrische Bestimmung der DNA Konzentration	72
2.2.4.3	DNA-Restriktionsverdau.....	72
2.2.4.4	Agarosegelelektrophorese	73
2.2.4.5	Polymerasekettenreaktion (PCR).....	73
2.2.4.6	Sequenzierung	74
2.2.4.7	Isolation viraler DNA aus infizierten Säugerzellen	74
2.2.4.8	DNA-Transfer (Southern Blot) und Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden	74
2.2.4.9	Radioaktive Markierung von DNA mit Zufallsoligomeren.....	76
2.2.4.10	Extraktion von zellulärer RNA	76
2.2.4.11	Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion	77
2.2.5	Proteinanalytik.....	78
2.2.5.1	Herstellung von Proteinextrakten	78
2.2.5.1.1	Gesamtproteinextrakte	78
2.2.5.1.2	Proteinfraktionierung nach zellulären Kompartimenten.....	78
2.2.5.2	Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford	80
2.2.5.3	Proteinfällung durch TCA-Präzipitation	80
2.2.5.4	sPLA ₂ Anreicherung durch Heparinbindung.....	81
2.2.5.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE).....	81
2.2.5.6	Protein Transfer (Western Blot)	82

2.2.5.7 Immunologischer Proteinnachweis	83
2.2.5.7.1 Western Blot Analyse	83
2.2.5.7.2 Immunfluoreszenz	83
2.2.5.7.3 Immunpräzipitation	85
3. Ergebnisse.....	86
3.1 Kinetik der MVMp induzierten Zelllyse und die zeitliche Korrelation mit Phospholipase A ₂ Aktivität	86
3.2 Rekombinante MVMp Viren als Vektoren für die kombinierte Expression von NS Proteinen und der parvoviralen PLA ₂ Domäne.....	90
3.2.1 Produktion und Titration der rekombinanten MVMp Viren.....	91
3.2.2 Expression und Replikation der rekombinanten MVMp Viren	95
3.2.3 Lytisches Potential der rekombinanten MVMp Viren und AA-Freisetzung	98
3.3 Untersuchungen zur Beteiligung zellulärer PLA ₂ an der MVMp induzierten Zelllyse	101
3.3.1 Einfluss selektiver Inhibitoren für zelluläre PLA ₂ auf die MVMp-inudzierte Zelllyse und AA-Freisetzung.....	101
3.3.2 Einfluss der Inhibitoren zellulärer PLA ₂ auf frühe Stadien des viralen Infektionszyklus	109
3.3.2.1 Einfluss der Inhibitoren zellulärer PLA ₂ auf den Viruseintritt.....	109
3.3.2.2 Einfluss der Inhibitoren zellulärer PLA ₂ auf die virale Replikation und Expression.....	111
3.4 Untersuchungen zur MVMp induzierten Aktivierung zellulärer PLA ₂	113
3.4.1 Zelluläre cPLA ₂	113
3.4.1.1 Phosphorylierung und Translokation von cPLA ₂ infolge der MVMp Infektion.....	114
3.4.1.2 MAPK Phosphorylierung	119
3.4.2 Zelluläre sPLA ₂	121
3.4.2.1 Sekretion von sPLA ₂ nach MVMp Infektion.....	122
3.4.2.1.1 Nachweis sezernierter sPLA ₂ durch sPLA ₂ Aktivitätsassay	122
3.4.2.1.2 Nachweis sezernierter sPLA ₂ durch Präzipitation	123
3.4.2.2. sPLA ₂ Subtypisierung von A9 Fibroblasten.....	125
3.4.2.3 Untersuchung der in A9 Fibroblasten exprimierten sPLA ₂ Subtypen auf Proteinebene	126
3.5 Virale Regulatoren der cPLA ₂ Aktivierung.....	128
3.5.1 Die parvovirale PLA ₂ im Kapsidprotein VP1	128
3.5.2 Die NS Proteine.....	129

3.5.2.1	Zellyse und AA-Freisetzung nach der MVMP585A/93G Infektion	130
3.5.2.2	PGE ₂ Freisetzung nach MVMP585A/93G Infektion.....	131
3.5.2.3	Aktivierung von MAPK und cPLA ₂ nach MVMP585A/93G Infektion.....	132
3.5.2.4	Zellyse nach MVMP595A/93G Infektion und Zugabe exogener AA	134
4.	Diskussion	136
4.1	Die MVMP induzierte Zellyse setzt PLA ₂ Aktivität voraus.....	136
4.2	Welche PLA ₂ sind in die Lyse MVMP infizierter Zellen involviert?.....	138
4.2.1	Zelluläre cPLA ₂ in der MVMP induzierten Zellyse.....	138
4.2.2	Zelluläre sPLA ₂ in der MVMP induzierten Zellyse.....	139
4.2.3	Parvovirale PLA ₂ in der MVMP induzierten Zellyse	140
4.3	Einfluss der viralen NS Proteine auf die MVMP induzierte PLA ₂ Aktivität und Zellyse	144
4.4	Mechanismen von PLA ₂ Aktivität im Zelltod.....	145
4.5	Modell zur Aktivierung zellulärer PLA ₂ in der MVMP Infektion	148
4.6	Ausblick	152
5.	Literatur	154

Abbildungsverzeichnis

Einleitung:	Abb. 1-1:	Schematischer Stammbaum der <i>Parvoviridae</i> .
	Abb. 1-2:	Genomorganisation und Kodierungsstrategie des MVMp Genoms.
	Abb. 1-3:	Dreidimensionale Struktur von MVM.
	Abb. 1-4:	Infektionszyklus autonomer Parvoviren.
	Abb. 1-5:	Struktur von Membranglycerophospholipiden und Positionen der hydrolytischen Spaltung durch Phospholipasen (PL).
	Tab. 1-1:	Klassifikation der Säuger PLA ₂ Enzyme (nach Dennis).
	Abb. 1-6:	Schematische Darstellung möglicher sPLA ₂ Funktionsmechanismen.
	Abb. 1-7:	Schematische Darstellung der Aktivierung von cPLA ₂ α.

Materialien und

Methoden:	Abb. 2-1:	Produktion rekombinanter MVMp Viren.
	Abb. 2-2:	Schematische Darstellung des Verfahrens zur Fraktionierung subzellulärer Kompartimente.
	Abb. 2-3:	Aufbau der Trans-Blot- Apparatur (Biorad) für den Western Blot.

Ergebnisse:	Abb. 3-1:	Kinetik der MVMp induzierten Zelllyse und [³ H]-AA Freisetzung.
	Abb. 3-2:	Kinetik der MVMp induzierten PGE ₂ Produktion.
	Abb. 3-3:	Schematische Darstellung der rekombinanten MVMp Vektoren.

- Abb. 3-4: Schematische Darstellung der Produktion rekombinanter MVMp Viren.
- Abb. 3-5: Titration der rekombinanten MVMp Viren.
- Abb. 3-6: Transduktion von GFP sowie viraler Proteine durch rekombinante MVMp Viren.
- Abb. 3-7: Replikation der rekombinanten MVMp Viren.
- Abb. 3-8: Lytischer Effekt und Freisetzung von [^3H]-AA nach Infektion mit rekombinanten MVMp Viren.
- Tab. 3-1: Zusammenstellung der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Inhibitoren für zelluläre PLA₂.
- Abb. 3-9: Einfluss von PLA₂ Inhibitoren auf die MVMp induzierte Zellyse.
- Abb. 3-10: Einfluss von PLA₂ Inhibitoren auf die MVMp induzierte [^3H]- AA Freisetzung.
- Abb. 3-11: Einfluss von PLA₂ Inhibitoren auf den MVMp Eintritt in die Zelle und den Kerntransport.
- Abb. 3-12: Einfluss von PLA₂ Inhibitoren auf die MVMp Replikation und Expression.
- Abb. 3-13: Schematische Darstellung der cPLA₂ Aktivierung.
- Abb. 3-14: cPLA₂ Phosphorylierung nach der MVMp Infektion.
- Abb. 3-15: Subzelluläre Fraktionen.
- Abb. 3-16: Intrazelluläre cPLA₂ Translokation nach der MVMp Infektion.
- Abb. 3-17: MAPK Aktivierung nach der MVMp Infektion.
- Abb. 3-18: Vereinfachte Darstellung der Funktionsmechanismen zellulärer sPLA₂.
- Abb. 3-19: sPLA₂ Aktivität in Kulturüberständen MVMp infizierter Zellen.
- Abb. 3-20: RT-PCR zur sPLA₂ Subtypisierung in MVMp

infizierten A9 Zellen.

Abb. 3-21: Detektion von sPLA₂ Subtyp IB im Western Blot.

Abb. 3-22: MVMp585A/93G induzierte Zelllyse und AA-Freisetzung.

Abb. 3-23: MVMp585A/93G induzierte PGE₂ - Freisetzung.

Abb. 3-24: Vergleich der MVMp585A/93G und wildtyp MVMp induzierten Aktivierung der MAPK und Phosphorylierung von cPLA₂.

Abb. 3-25: MVMp585A/93G induzierte Zelllyse bei exogener Zugabe von AA.

Diskussion:

Abb. 4-1: Modell über die Stimulation zellulärer PLA₂ nach der MVMp Infektion.

Abkürzungsverzeichnis

α	anti oder alpha
μ	Mikro (10^{-6})
$^{\circ}\text{C}$	Grad Celsius
AA	Arachidonsäure (<i>Arachidonic acid</i>)
AACOCF ₃	Arachidonyltrifluoromethylketon
AAV	Adeno-assoziiertes Virus
ADV	<i>Aleutian Mink Disease Virus</i>
APAR <i>bodies</i>	<i>Autonomous Parvovirus Associated Replication bodies</i>
APS	Ammoniumperoxydisulfat
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaare
BEL	Bromoenollacton
BPV	Rinder (<i>Bovine</i>) Parvovirus
BSA	Rinder (<i>Bovine</i>) Serumalbumin
c	centi (10^{-2})
C2	Ca^{2+} Bindungsdomäne in cPLA ₂
CaMKII	Ca^{2+} <i>Calmodulin dependent kinase</i>
CDK	<i>Cyclin dependent kinase</i>
Ci	Curie
COX	Cyclooxygenase
cPLA ₂	zytosolische (<i>cytosolic</i>) PLA ₂
cpm	<i>counts per minute</i>
CPV	Schweine (<i>Canine</i>) Parvovirus
CRM1	<i>chromosome region maintenance protein 1</i>
Cy3	Indocarbocyanin
Da	Dalton
dCTP	2'-Desoxyadenosin-5'-triphosphat
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dRF	dimere replikative Form
DTT	Dithiothreitol
EBV	Eppstein-Barr Virus
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i>
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGFP	<i>Enhanced Green Fluorescent Protein</i>
EtBr	Ethidiumbromid

FCS	Fötales Kälberserum (<i>Fetal Calf Serum</i>)
FPV	Katzen (<i>Feline</i>) Parvovirus
g	Gramm oder Erdbeschleunigung
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
h	Stunde(n)
H-1	Parvovirus H-1
HCMV	Humanes Cytomegalie Virus
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HRP	Meerrettichperoxidase (<i>horse radish peroxidase</i>)
HSPG	Heparansulfatproteoglykan
His	Histidin
IF	Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
IP	Immunpräzipitation
iPLA ₂	Ca ²⁺ -unabhängige (<i>independent</i>) PLA ₂
ITR	<i>inverted terminal repeat</i>
k	kilo (10 ⁻³)
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
KRV	<i>Kilham</i> Rattenparvovirus
L	Liter
LB	Luria Broth
LDH	Lactatdehydrogenase
LOX	Lipoxygenase
LT	Leukotrien
LTR	<i>long terminal repeat</i>
m	Meter oder milli (10 ⁻³)
M	molar
mA	Milliampere
MAFP	Methylarachidonylfluorophosphonat
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MCS	<i>multiple cloning site</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>
min	Minuten
Mnk1	<i>MAPK-interacting kinase 1</i>
MPV	Maus Parvovirus
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
mRF	monomere replikative Form
MTT	Dimethylthiazoldiphenyltetrazoliumbromid
MVM	<i>Minute Virus of Mice</i>
MW	<i>molecular weight</i>
n	nano (10 ⁻⁹)
NADPH	Nicotinamid-Adenin-Dinucleotid-Phosphat
NDV	<i>New Castle Disease Virus</i>

NLS	<i>nuclear localisation signal</i>
nt	Nukleotide
OD	Optische Dichte
ORF	<i>open reading frame</i>
p	pico (10^{-12})
PAGE	Polyacrylamidgel-Elektrophorese
PAF	<i>platelet activating factor</i>
PBS	Phosphat gepufferte Lösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion (<i>Polymerase chain reaction</i>)
Pfu	<i>plaque forming unit</i>
PG	Prostaglandin
PIP ₂	Phosphatidylinositol-2-phosphat
PKC	Proteinkinase C
PL	Phospholipase
PLA ₂	Phospholipase A ₂
PPV	Schweine (<i>Porcine</i>) Parvovirus
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	<i>rounds per minute</i>
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription-PCR
RU	<i>Replication Unit</i>
ss	<i>single stranded</i>
SDS	Natriumdodecylsulfat (<i>Sodium dodecyl sulphate</i>)
sn	stereospezifische Nummerierung
SSC	Lösung aus Natriumchlorid und Natriumzitat
sPLA ₂	sekretorische PLA ₂
SV40	Simian Virus 40
TAE	Tris-Azetat-EDTA
TCA	Trichloressigsäure
TE	Tris-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TNF α	Tumornekrosefaktor α
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
UV	ultraviolett
Vol	Volumen
VP1nt	VP1 N-terminaler Bereich
VSV	Vesikulostomatitis Virus
VTE	Virus-Tris-EDTA

Anmerkungen

In der vorliegenden Arbeit

- wird die Bezeichnung H69G für Punktmutationen in einer Aminosäuresequenz verwendet, in diesem Fall: ursprünglicher Aminosäurerest: Histidin (Ein-Buchstaben-Code: H), Positionsnummer: 69, ersetzender Aminosäurerest: Glycin (Ein-Buchstaben-Code: G)
- wird der Dezimalpunkt, nicht das -komma, als Dezimaltrennzeichen verwendet

1. Einleitung

1.1 Autonome Parvoviren

Autonome Parvoviren gehören zur Familie der *Parvoviridae* und damit zu den kleinsten Vertretern unter den Viren (*parvus*, lateinisch: klein). Das virale Genom von nur ca. 5000 nt liegt als einzelsträngige lineare DNA vor und wird von einem nicht-umhüllten ikosaedrischen Viruskapsid mit einem Durchmesser von 18-26 nm umschlossen.

Parvoviren wurden in den sechziger Jahren entdeckt, als man sie aus Tumorgeweben, Tumorzelllinien und mit Karzinogenen behandelten Versuchstieren isolierte (Kilham und Olivier, 1959; Toolan, 1961; Lum und Schreiner, 1963). Eine Isolation aus normalem Gewebe blieb erfolglos, so dass man damals vermutete, Parvoviren besäßen onkogene Eigenschaften, wie sie z.B. bereits für Papillomviren beschrieben waren (Black, 1968). Diese irrtümliche Interpretation der Viruspräsenz in Tumorgeweben konnte allerdings bald widerlegt werden, indem gezeigt wurde, dass eine Parvovirusinfektion von Versuchstieren nicht in einem erhöhten Risiko für eine Krebserkrankung resultiert (Toolan, 1967). Dagegen wurde sogar die Hemmung von Tumorentstehung und -wachstum in den infizierten Tieren beobachtet (Guetta *et al.*, 1986; Dupressoir *et al.*, 1989; Rommelaere und Cornelis, 1991). Diese als Onkosuppression bezeichnete Auswirkung der parvoviralen Infektion wurde des Weiteren auch bei verschiedenen Tumoren, wie Leukämien, Sarkomen und Karzinomen beschrieben (Guetta *et al.*, 1986; Yang, 1987; Van Pachterbeke *et al.*, 1993). Der detaillierte Mechanismus, welcher der parvoviralen Onkosuppression zugrunde liegt, ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

1.1.1 Taxonomie

Die Familie der *Parvoviridae* unterteilt sich in zwei Unterfamilien, die *Parvovirinae* (Wirbeltiere infizierende) und die *Densovirinae* (Insekten infizierende) (Abb. 1-1)

(Pringle, 1998; Muzyczka, 2001). Die *Parvovirinae* wiederum unterteilen sich in *Dependoviren* und die autonomen Parvoviren.

Dependoviren umfassen die in sechs Serotypen vorliegenden Adeno-assoziierten Viren (AAV), welche für die Replikation auf eine Koinfektion mit Helferviren wie Adeno-, Herpes Simplex- oder Papillomviren angewiesen sind (Atchison *et al.*, 1965; Hoggan *et al.*, 1966; Thomson *et al.*, 1994; Ogston *et al.*, 2000). *Dependoviren* können in Abwesenheit des Helfervirus in das Wirtszellgenom integrieren und somit eine latente Infektion erzeugen (Berns *et al.*, 1975).

Autonome Parvoviren umfassen die Gattungen der *Erythroviren* und *Parvoviren*. Eine Integration dieser Viren in das Wirtszellgenom ist bisher nicht beobachtet worden. Autonome Parvoviren sind bei ihrer Replikation nicht auf Helferviren angewiesen, sie sind diesbezüglich allerdings stark vom Vorhandensein zellulärer Faktoren abhängig, deren Expression eng mit der Proliferation und Differenzierung der Zelle assoziiert ist (Spalholz und Tattersall, 1983). Bisher wurden zwei humanpathogene Viren der Gattung *Erythrovirus* beschrieben, B19 (Okochi *et al.*, 1984) und V9 (Nguyen *et al.*, 1999). Sie sind durch ihren Tropismus für erythroide Vorläuferzellen (Brown *et al.*, 1993) charakterisiert und verursachen verschiedene hämatologische Funktionsstörungen bei Immunsupprimierten, Kindern oder Schwangeren (Kishore

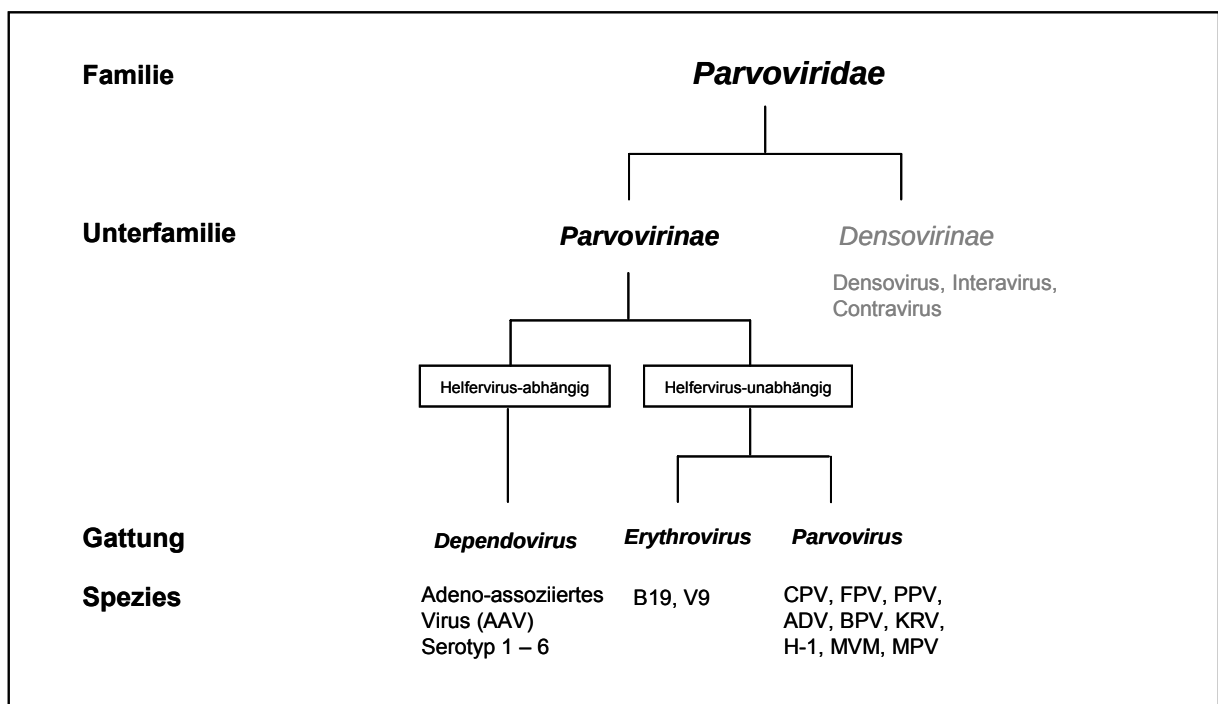


Abb.1-1: Schematischer Stammbaum der *Parvoviridae*.

und Kapoor, 2000), wie z.B. die durch B19 hervorgerufene *Erythema infectiosum* (Pattison, 1987). Autonome Parvoviren der Gattung *Parvovirus* werden aufgrund ihrer Wirtsspezifität in mehrere Untergruppen unterteilt. Man unterscheidet zwischen dem Hundeparvovirus CPV (*Canine Parvovirus*), Katzenparvovirus FPV (*Feline Parvovirus*), Parvovirus des Schweins PPV (*Porcine Parvovirus*), Nerzparvovirus ADV (*Aleutian Mink Disease Virus*), Rinderparvovirus BPV (*Bovine Parvovirus*), die Rattenparvoviren KRV (*Kilham Rat Parvovirus*) und H-1 sowie die Mausparvoviren MPV (*Mouse Parvovirus*) und MVM (*Minute Virus of Mice*). Vor allem die autonomen Nagerparvoviren MVM und H-1 sind von großem Interesse, da sie nicht nur Zellen ihres natürlichen Wirtes, den Nagern, infizieren, sondern auch verschiedene humane Zellen. Darüber hinaus sind sie im Menschen kaum pathogen und bieten sich somit für eine potentielle Applikation zu therapeutischen Zwecken an. Der Prototyp des Mausparvovirus MVM, MVMp, ist Gegenstand der vorliegenden Arbeit und wird im Folgenden ausführlicher beschrieben.

1.2 *Minute Virus of Mice* (MVM)

Das *Minute Virus of Mice* (MVM) ist das bisher am besten untersuchte Nagerparvovirus (Jacoby *et al.*, 1996). Hinsichtlich seines Tropismus wird es *in vitro* in zwei allotrope Stämme unterteilt: das immunsuppressive MVMi, welches murine T-Lymphozyten infiziert (Bonnard *et al.*, 1976) und den Prototypstamm MVMp, welcher ausschließlich Fibroblasten infiziert (Crawford, 1966). Die DNA-Sequenz beider Stämme ist zu 97 % identisch. Beide Virusstämme binden die Zelle über denselben Rezeptor (Spalholz und Tattersall, 1983) und sind somit in der Lage, die jeweilige Wirtszelle des anderen Stammes zu infizieren. Folglich geht man davon aus, dass der Allotropismus auf die spezifische Interaktion viraler Determinanten mit intrazellulären Faktoren beruht. Tatsächlich können diese viralen Determinanten auf eine Region von 14 Aminosäuren im Kapsidprotein VP2 von MVM eingegrenzt werden (Gardiner und Tattersall, 1988; Ball-Goodrich *et al.*, 1991; Maxwell *et al.*, 1995; Agbandje-McKenna *et al.*, 1998). Serologisch lassen sich MVMp und MVMi nicht unterscheiden, jedoch haben *in vivo* Untersuchungen ergeben, dass eine MVMi Infektion in neugeborenen Mäusen lethal verläuft, wobei eine Infektion mit MVMp weder für neugeborene noch adulte Tiere pathogen ist (Kimsey *et al.*, 1986).

1.2.1 Das parvovirale Genom

MVMp verfügt über ein einzelsträngiges lineares DNA Genom (Abb. 1-2 A) von 5149 nt Länge, welches in negativer Orientierung in das Kapsid verpackt ist. Die beiden Enden der genomischen DNA weisen zwei, ITR (*inverted terminal repeats*) genannte, palindromische Sequenzabschnitte auf, die zur Ausbildung von Haarnadelstrukturen führen. Das am 3' Ende befindliche Palindrom mit einer Länge von 121 nt nimmt eine, auch als *rabbit ear* bekannte, Y-Form ein, wobei das 5' Palindrom mit einer Länge von 246 nt U-förmig oder alternativ T-förmig erscheint (Astell *et al.*, 1983a). Die Sequenzen der Haarnadelstrukturen beinhalten den Großteil der Informationen für die virale Replikation sowie die Verpackung des Genoms und garantieren diesbezüglich, dass es zu 99 % als Minus-Strang in den Virionen vorliegt (Berns und Linden, 1995).

Sämtliche für virale Proteine kodierende Sequenzen liegen auf dem zur genomischen DNA komplementären Plus-Strang. Dieser wird im Laufe der Virusreplikation synthetisiert (Cotmore und Tattersall, 1987). Er setzt sich aus zwei überlappenden Transkriptionseinheiten zusammen, welche drei Klassen von Transkripten (R1, R2 und R3) generieren (Pintel *et al.*, 1983; Cotmore und Tattersall, 1986b; Cotmore und Tattersall, 1987) (Abb. 1-2 C). Alle Transkripte werden durch ein Polyadenylierungssignal [AATAAA] terminiert (Clemens und Pintel, 1987). Die Regulation der beiden Transkriptionseinheiten erfolgt jeweils durch einen eigenen Promotor. Der zuerst aktive, sogenannte „frühe“, P4-Promotor, welcher bei der Genkarteneinheit 4 (Abb. 1-2 B) lokalisiert ist, reguliert die Synthese der Transkripte R1 (4.8 kb) und R2 (3.3 kb), welche für die Nichtstrukturproteine kodieren (Cotmore und Tattersall, 1986b). Transkript R2 entsteht hierbei durch Herausschneiden eines großen Introns zwischen Karteneinheit 10 und 39. Die Aktivität des P4-Promotors wird durch verschiedene Transkriptionsfaktoren gesteuert, indem diese an unterschiedliche regulatorische Elemente binden (Faisst *et al.*, 1994; Fuks *et al.*, 1996; Raab *et al.*, 2002). Die Regulation durch Transkriptionsfaktoren kann ras-abhängig (Spegelaere *et al.*, 1991; Fuks *et al.*, 1996) oder S-Phase-spezifisch erfolgen (Deleu *et al.*, 1998; Deleu *et al.*, 1999). Der P38-Promotor, bei der Karteneinheit 38 lokalisiert, steuert die Synthese des R3 Transkripts. Abgesehen von einer geringen Grundaktivität, erfolgt die Regulation von P38 durch das virale NS1 Protein (Rhode, 1985). Hierzu interagiert NS1 mit dem zellulären Transkriptionsfaktor

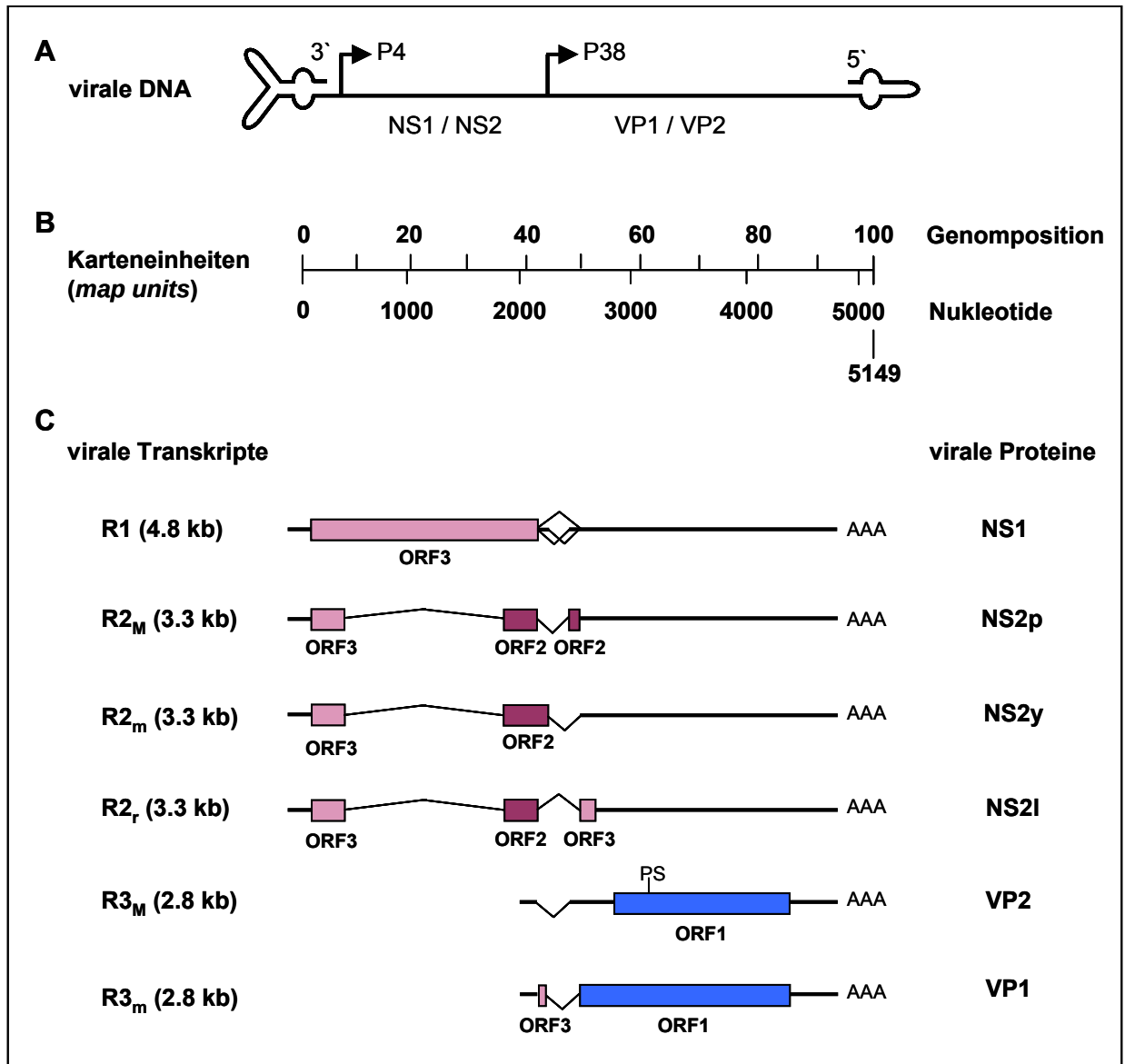


Abb. 1-2: Genomorganisation und Kodierungsstrategie des MVMP Genoms.

(A) Schema des einzelsträngigen linearen Genoms in negativer Orientierung. Die terminalen Haarnadelstrukturen, die auch als ITR (*inverted terminal repeats*) bezeichnet werden, sind skizziert. Während der P4-Promotor die Transkription der Nichtstrukturproteine (NS1/NS2) reguliert, ist der Region, die für die Kapsidproteine (VP1/VP2) kodiert, der P38-Promotor vorgeschaltet. (B) Einteilung des viralen Genoms in Karteneinheiten (*map units*) und gleichzeitige Angabe der Nukleotidposition. (C) Das virale Genom kodiert für die drei Transkripte R1, R2 und R3, die durch verschiedene Spleißvarianten der kleinen Introns in jeweils drei Formen vorliegen können (M: *major*, m: *minor*, r: *rare* Transkriptform). Die viralen mRNAs kodieren für die Nichtstrukturproteine NS1 und NS2 (drei Isoformen) sowie für die viralen Kapsidproteine VP1 und VP2. Die verschiedenen offenen Leserahmen sind mit ORF 1, 2 oder 3 benannt. PS bezeichnet die proteolytische Schnittstelle in VP2, die zur Entstehung von VP3 führt. AAA steht für den PolyA- Schwanz der mRNAs.

Sp1 (Kradly und Ward, 1995). Da die Aktivierung des P38 Promotors somit erst nach Expression von NS1 erfolgen kann, wird er auch als „später“ Promotor bezeichnet. Unter Verwendung drei verschiedener offener Leserahmen und durch differentielle Spleißvorgänge entstehen die verschiedenen Transkripte (Abb. 1-2 C). Im offenen Leserahmen ORF 3 (*open reading frame 3*) entsteht aus Transkript R1 das NS1

Protein. Im Verlauf des Herausschneidens mehrerer kleiner Introns aus Transkript R2 variieren definierte Donor- und Akzeptorstellen in bestimmten Häufigkeiten (*M-major* 70 %, *m-minor* 25 %, *r-rare* 5%). Infolge dieser Variation liegt das kleinere Nichtstrukturprotein NS2 in drei möglichen Isoformen vor (Morgan und Ward, 1986; Cotmore und Tattersall, 1990). Sie unterscheiden sich nur im C-terminalen Teil, da der N-terminale Teil, identisch mit dem von NS1, auch im Leserahmen ORF 3 kodiert ist (Cotmore und Tattersall, 1986b; Jongeneel *et al.*, 1986; Cotmore und Tattersall, 1987). Der ebenfalls allen NS2 Proteinen gemeinsame, mittlere Teil wird im Leserahmen ORF 2 abgelesen. Durch die Translation der R3 Transkripte im Leserahmen ORF 1 entstehen die Kapsidproteine VP1 und VP2, wobei das Transkript für VP2 durch Herausschneiden eines kleinen Introns erzeugt wird (Jongeneel *et al.*, 1986; Labieniec-Pintel und Pintel, 1986). Durch die variierenden Leserahmen und die differentiellen Spleißvorgänge wird die stark begrenzte Kodierungskapazität des sehr kleinen parvoviralen Genoms enorm erweitert. Weiterhin kann durch die geregelte Häufigkeit der Spleißvorgänge das optimale Verhältnis der verschiedenen viralen Transkriptionsprodukte sichergestellt und somit deren Funktion im viralen Infektionszyklus beeinflusst werden.

1.2.2 Die parvoviralen Proteine

1.2.2.1 Das Nichtstrukturprotein 1 (NS1)

Mit einem Molekulargewicht von 83-86 kDa ist NS1 das größte der MVMp Nichtstrukturproteine. Es ist mit einer Halbwertszeit von ca. 6.5 h relativ stabil (Cotmore und Tattersall, 1987) und akkumuliert aufgrund einer NLS (*nuclear localization signal*)-Sequenz im N-terminalen Teil des Proteins vor allem im Zellkern (Cotmore und Tattersall, 1986a; Nüesch und Tattersall, 1993). NS1 ist ein multifunktionelles Protein, dessen vielfältige Eigenschaften und Aktivitäten im Laufe des Infektionszykluses durch posttranslationelle Modifikationen, darunter vor allem durch differentielle Phosphorylierungen, reguliert werden (Nüesch *et al.*, 1998; Corbau *et al.*, 1999; Corbau *et al.*, 2000; Daeffler *et al.*, 2003). Neben seiner großen Bedeutung für die virale Replikation, agiert NS1 im Laufe des infektiösen Zyklus sowohl als Transaktivator und Zellzyklusmanipulator als auch als Bestandteil der virusinduzierten Zytotoxizität.

NS1 als Regulator der viralen Replikation. Viele Funktionen und Eigenschaften des NS1 Proteins sind für die virale Replikation von essentieller Bedeutung (Cotmore und Tattersall, 1987; Tullis *et al.*, 1988). Es bindet und hydrolysiert ATP (Wilson *et al.*, 1991; Christensen *et al.*, 1995), hat Helikase- und sowohl sequenz- und auch strangspezifische Endonukleaseaktivität (Wilson *et al.*, 1991; Cotmore *et al.*, 1992; Nüesch *et al.*, 1995). Die zeitliche Koordination der unterschiedlichen Aktivitäten erfolgt durch mehrere Protein Kinase C (PKC) katalysierte Phosphorylierungen, von denen ein Großteil auf die zwei Vertreter PKC λ und PKC η zurückgeführt werden konnte (Dettwiler *et al.*, 1999; Corbau *et al.*, 2000; Nüesch *et al.*, 2001; Lachmann *et al.*, 2003; Nüesch *et al.*, 2003).

NS1 als Regulator des Zellzyklus. Die Expression von NS1 wird durch den „frühen“ Promotor P4 reguliert (siehe 1.2.1.) und ist streng auf zelluläre Faktoren angewiesen, welche präferentiell während der S-Phase des Zellzyklus induziert werden (Deleu *et al.*, 1998; Deleu *et al.*, 1999; Bashir *et al.*, 2000). Aufgrund dieser Abhängigkeit sind sämtliche NS1 regulierten Vorgänge wie auch die virale Replikation an die S-Phase des Wirtszellzyklus gekoppelt. MVMp kann dieses Stadium des Zellzyklus nach Infektion zwar nicht induzieren (Cotmore und Tattersall, 1986a; Cotmore und Tattersall, 1987), doch kann NS1 nach Akkumulation in proliferierenden Zellen verschiedene Zellzyklusregulatoren beeinflussen (Op De Beeck *et al.*, 2001). Dies führt zu einem Zellzyklusarrest an der Grenze zwischen der späten S- und frühen G2-Phase (Op De Beeck *et al.*, 1995). Eine mögliche Erklärung des Arrests könnten aber auch NS-1 induzierte Doppelstrangbrüche im Chromatin sein (Op De Beeck und Caillet-Fauquet, 1997).

NS1 als Transaktivator. NS1 kann mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren und Ko-Aktivatoren interagieren. Eine Hauptfunktion von NS1 als Transaktivator liegt in der Regulation des viralen P38-Promotors, was zur Expression der Kapsidproteine führt (siehe 1.2.1). Weiterhin wurde NS1 als stimulatorischer oder inhibitorischer Transregulator anderer viraler und auch zellulärer Promotoren beschrieben (Rhode und Richard, 1987; Faisst *et al.*, 1993; Vanacker *et al.*, 1993; Legendre und Rommelaere, 1994; Fu *et al.*, 2002; Mitchell, 2002).

NS1 als zytotoxisches Protein. Die erfolgreiche Infektion permissiver Zellen mit MVMp führt zu einer Vielzahl zellulärer Veränderungen, die toxisch sind und zur Lyse der Zelle führen. Die Induktion dieser Zytotoxizität kann allein durch NS1 erfolgen (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990; Corbau *et al.*, 2000). Die zellulären Prozesse, welche

dem NS1 vermittelten zytopathischen Effekt zugrunde liegen, sind nicht vollständig geklärt. Jedoch ist dieser Effekt wahrscheinlich nicht die Folge einer einzigen sondern verschiedener NS1 Aktivitäten (Rommelaere und Cornelis, 1991; Corbau *et al.*, 2000). Als ein Schwerpunkt der vorliegenden Arbeit wird dieser Aspekt in Abschnitt 1.3.1. weiter vertieft.

1.2.2.2 Das Nichtstrukturprotein 2 (NS2)

NS2 ist mit einem Molekulargewicht von 23-25 kDa das kleinere der beiden MVMp Nichtstrukturproteine. Aufgrund unterschiedlicher Spleißvorgänge liegt NS2 in drei Isoformen vor, die im N-terminalen Bereich sowohl untereinander als auch mit NS1 identisch sind (siehe 1.2.1). Der Unterschied zwischen den NS2 Isoformen wird ausschließlich durch wenige Aminosäuren im C-terminalen Bereich des Proteins hervorgerufen. Über die Funktionen von NS2 ist bisher nur wenig bekannt, doch werden diese, wie bereits für NS1 beschrieben, sehr wahrscheinlich durch spezifische Phosphorylierungen reguliert (Cotmore und Tattersall, 1990). Es wurde gezeigt, dass NS2 ausschließlich in permissiven Zellen der natürlichen murinen Wirtsspezies für eine produktive MVMp Infektion essentiell ist (Naeger *et al.*, 1990; Brownstein *et al.*, 1992; Cater und Pintel, 1992). Weitere Untersuchungen lassen auf eine wesentliche Bedeutung von NS2 bei der Amplifikation der viralen DNA, der Translation viraler Proteine und der korrekten Verpackung von Nachkommenviren schließen (Li und Rhode, 1991; Li und Rhode, 1993; Naeger *et al.*, 1993; Cotmore *et al.*, 1997). Auch eine mit NS1 kooperierende Rolle von NS2 im Hinblick auf die Induktion toxischer Veränderungen in der Zelle wird nicht ausgeschlossen (Brandenburger *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 1993; Daeffler *et al.*, 2003). Abgesehen von zwei Mitgliedern der 14-3-3 Familie zellulärer Proteine (Brockhaus *et al.*, 1996), wurde Crm1 (*chromosome region maintenance protein 1*), ein Kernexportfaktor, als Interaktionspartner von NS2 identifiziert (Bodendorf *et al.*, 1999). Die Interaktion von NS2 mit Crm1 ist für den Transport verpackter Nachkommenviren vom Zellkern ins Zytoplasma unentbehrlich (Eichwald *et al.*, 2002; Miller und Pintel, 2002).

1.2.2.3 Die Kapsidproteine

Die Kapsidproteine VP1 und VP2 gehen als primäre Produkte aus der Translation spät exprimierter mRNAs hervor. Die Translation beginnt an zwei verschiedenen Initiationscodons als Folge posttranskriptionaler Spleißvorgänge der Vorläufer mRNA. Somit besteht das VP2 Protein aus dem C-terminalen Teil von VP1. Dennoch haben VP1 und VP2 unterschiedliche biologische Funktionen im viralen Infektionszyklus.

VP1 stellt nur einen kleinen Teil des Viruskapsids dar und ist für dessen Zusammenbau und die Verpackung des Genoms entbehrlich. Für die Infektiosität des Virus ist VP1 hingegen unerlässlich (Hermonat *et al.*, 1984; Tullis *et al.*, 1993). Es besitzt einen N-terminalen Bereich von 143 Aminosäuren (Tattersall *et al.*, 1977) (VP1nt) welcher sich im Innern des Viruskapsids befindet (Cotmore *et al.*, 1999). Dies wurde in Untersuchungen hinsichtlich der Zugänglichkeit der Kapside für Proteasen oder spezifische Antikörper gezeigt. Allerdings kann VP1nt ohne den Zerfall des intakten Viruskapsids nach außen geklappt werden (Cotmore *et al.*, 1999). Innerhalb dieser Domäne befinden sich vier basische Regionen, die eine sehr ausgeprägte Homologie zu üblichen Kernlokalisierungssignalen aufweisen. Diese basischen Regionen dienen einerseits dem Kerntransport neu synthetisierter VP1 Peptide und haben andererseits auch wesentliche Funktion in einem frühen Stadium der Infektion unmittelbar vor Eintritt des Virus in den Zellkern. Dies konnte auch für CPV gezeigt werden (Vihinen-Ranta *et al.*, 1998; Lombardo *et al.*, 2002). Darüber hinaus wurde in VP1nt der meisten Parvoviren eine Region von ungefähr 40 Aminosäuren, mit einer Sequenzidentität von etwa 90 %, identifiziert. Diese Region enthält ein Motiv, der in Viren bisher nicht identifizierten sekretorischen Phospholipase A₂ (sPLA₂) (Zadori *et al.*, 2001; Dorsch *et al.*, 2002). Die Sequenzidentität mit bisher bekannten sPLA₂ Enzymen ist sehr gering und auf Motive für die katalytische Aktivität und Ca²⁺-Bindung begrenzt. Mutationsanalysen des rekombinanten VP1nt Peptids sowie des Virusgenoms von beispielsweise PPV ergaben, dass eine verringerte enzymatische Aktivität der parvoviralen PLA₂ mit einer verminderten Infektiosität des Virus einhergeht. Diese mutierte Viren, akkumulieren im späten Endosom, ihre DNA wird nicht in den Zellkern überführt und wird demnach auch nicht repliziert (Zadori *et al.*, 2001; Girod *et al.*, 2002). Man geht

davon aus, dass sich die Konformation des Viruskapsids durch besondere Umgebungsbedingungen, wie z.B. niedrige pH-Werte, im späten Endosom verändert. Infolge dieser würde die virale PLA₂ Domäne vom Innern des Kapsids nach außen geklappt und zugänglich werden (Zadori *et al.*, 2001; Suikkanen *et al.*, 2003b). In der Tat wurde diese Veränderung im intakten Kapsid nach einer Hitzebehandlung bei 65 °C bzw. 70 °C für PPV und AAV-2 nachgewiesen (Zadori *et al.*, 2001; Bleker *et al.*, 2005). Detaillierte enzymatische Untersuchungen der PLA₂ Domänen von PPV, AAV-2 und B19 zeigten kürzlich, dass sich diese in ihrer katalytischen Aktivität, Substratspezifität und Empfindlichkeit gegenüber einer Reihe von sPLA₂ Inhibitoren untereinander und auch im Vergleich zu bisher bekannten sPLA₂ Subtypen stark unterscheiden (Canaan *et al.*, 2004).

VP2 ist sowohl für den Kapsidzusammenbau als auch die darauffolgende Verpackung der viralen DNA absolut notwendig (Tullis *et al.*, 1993; Willwand und Hirt, 1993). Sein N-Terminus bedingt den Export neusynthetisierter Viruspartikel vom Zellkern in das Zytoplasma (Maroto *et al.*, 2004). Weiterhin determinieren bestimmte Regionen in VP2 den parvoviralen Wirtszelltropismus (Maxwell *et al.*, 1995), andere wiederum spielen eine Rolle für die Bindung des zellulären Rezeptors.

VP3, das nur einen sehr geringen Teil des Kapsids ausmacht (Tattersall *et al.*, 1977), entsteht ausschließlich durch eine proteolytische Abspaltung von ungefähr 20 Aminosäuren am N-terminalen Ende des VP2 Proteins. Diese Abspaltung wird nur bei infektiösen Partikeln beobachtet. Welche Rolle VP3 im infektiösen Zyklus spielt ist bisher ungeklärt.

1.2.3 Der Aufbau parvoviraler Partikel

Die parvoviralen Partikel haben einen Durchmesser von 18-26 nm und ein Molekulargewicht von $5.5-6.2 \times 10^6$ Da (Agbandje, 1995). Sie setzen sich aus dem einzelsträngigen linearen DNA-Genom und einem die DNA umgebenden ikosaedrischen Viruskapsid zusammen. Das Kapsid (Abb. 1-3) besteht aus 60 ähnlichen Untereinheiten, welche sich durch je 8 antiparallele β -Faltblätter (Agbandje-McKenna *et al.*, 1998) auszeichnen. Infektiöse parvovirale Kapside setzen sich aus den drei Strukturproteinen VP1 (83-86 kDa), VP2 (64 kDa) und VP3

(60-62 kDa) zusammen, wobei VP2 mit 80 % die Hauptkomponente darstellt (Cotmore und Tattersall, 1987). Nukleinsäurefreie, nichtinfektiöse Viruspartikel hingegen bestehen ausschließlich aus den Kapsidproteinen VP1 und VP2 (Paradiso, 1981; Santaren *et al.*, 1993) oder nur aus VP2-Untereinheiten (Agbandje, 1995). An der Außenseite jedes infektiösen Parvoviruspartikels befindet sich ein Molekül des viralen Nichtstrukturproteins NS1 (siehe 1.2.2.1.), welches kovalent an das 5' Ende des im Innern des Kapsids befindlichen viralen Genoms gebunden ist (Cotmore und Tattersall, 1989). Dieses Molekül wird während der Infektion endonukleolytisch abgespalten (Cotmore, 1995). Parvoviren sind nicht membranumhüllt und demnach gegenüber extremen äußeren Bedingungen wie Hitze, Detergentienbehandlung und pH-Werten von 3-9 sehr stabil.

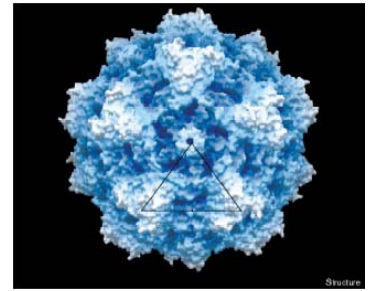


Abb. 1-3: Dreidimensionale Struktur von MVM.
(Agbandje-McKenna *et al.* 1998)

1.2.4 Der parvovirale Infektionszyklus

Der Infektionszyklus autonomer Parvoviren ist in Abb. 1-4 vereinfacht schematisch dargestellt.

Adsorbition. Die Infektion permissiver Zellen beginnt mit der Adsorbition des Viruspartikels an spezifische Rezeptoren der Zelloberfläche. Während diese für die Parvoviren B19, CPV, FPV, ADV und AAV bereits identifiziert wurden (Brown *et al.*, 1993; Summerford und Samulski, 1998; Qing *et al.*, 1999; Summerford *et al.*, 1999; Kaludov *et al.*, 2001; Parker *et al.*, 2001; Di Pasquale *et al.*, 2003), weiß man über den zellulären Rezeptor von MVMp bisher nur sehr wenig. Aufgrund der hohen Empfindlichkeit gegenüber Trypsin und Neuraminidase geht man davon aus, dass es sich um ein Glykoprotein mit gebundenen N-Acetylneuraminsäureresten handelt (Cotmore und Tattersall, 1987). Derartige Moleküle können in hoher Anzahl auf der Oberfläche verschiedener Zelltypen gefunden werden (Linser *et al.*, 1977; Spalholz und Tattersall, 1983).

Endozytose und Kerntransport. Nach der rezeptorvermittelten Endozytose erfolgt der Transport des Viruspartikels entlang der Mikrotubuli bis zum perinukleären Raum

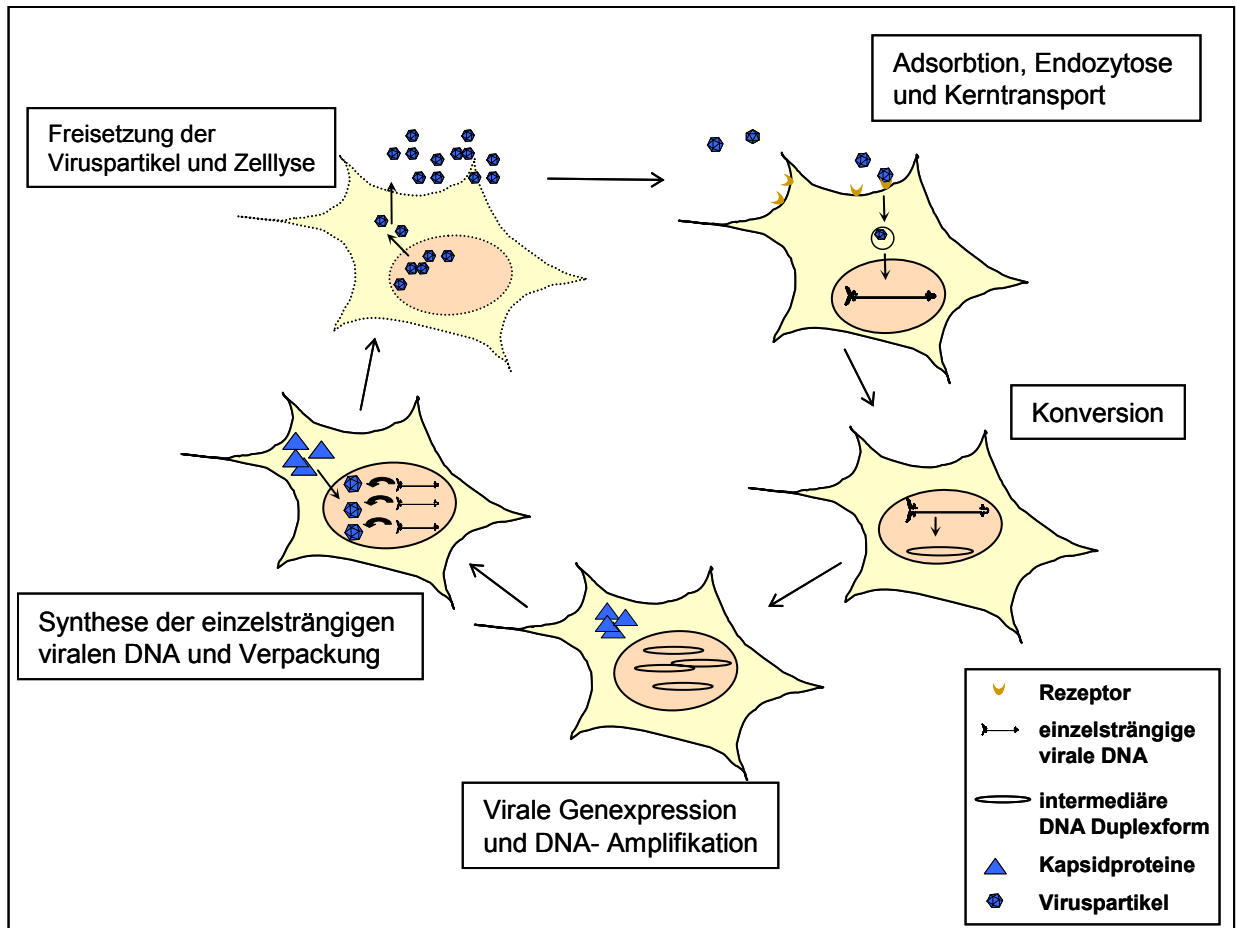


Abb. 1-4: Infektionszyklus autonomer Parvoviren.

Nach Adsorption des Viruspartikels und rezeptorvermittelter Endozytose wird es in den perinukleären zytoplasmatischen Raum freigesetzt. Nach erfolgreichem Kerntransport wird die einzelsträngige lineare Virus-DNA zunächst in eine doppelsträngige Form überführt (Konversion). Anschließend erfolgt die NS1-abhängige DNA-Amplifikation und die Transkription der mRNA, die zur Translation der viralen Proteine in das Zytoplasma transportiert wird. Im Anschluss an den Rücktransport der viralen Proteine in den Zellkern erfolgen zeitgleich die Synthese der einzelsträngigen viralen DNA sowie deren Verpackung in assemblierte Kapside. Mit der Lyse der Zelle werden die Nachkommenviren freigesetzt.

(Linser *et al.*, 1977; Linser *et al.*, 1979; Vihinen-Ranta *et al.*, 1998; Ros *et al.*, 2002; Suikkanen *et al.*, 2002; Suikkanen *et al.*, 2003a). Hier wird das Virus in das Zytoplasma freigesetzt (Vihinen-Ranta *et al.*, 2000). Ob die Dekapsidierung des Viruspartikels im Endosom, im Zytoplasma oder erst nach Eintritt in den Zellkern erfolgt, ist bisher ungeklärt (Feldherr *et al.*, 1984; Ros *et al.*, 2002; Ros und Kempf, 2004). Es ist sehr wahrscheinlich, dass das Viruskapsid im Endosom zunächst grundlegende konformationelle Veränderungen durchläuft, infolge derer zum einen das Kapsidprotein VP3 aus dem Hauptkapsidprotein VP2 abgespalten wird und zum anderen der N-terminale Bereich vom Kapsidprotein VP1 auf die Aussenseite des Partikels gelangt. Dieser Bereich enthält einerseits basische Regionen, die als NLS für die Regulation des Kerntransports intakter oder teilweise zerfallener Viruskapside verantwortlich sind (Vihinen-Ranta *et al.*, 1997; Vihinen-Ranta *et al.*, 2000; Lombardo

et al., 2002; Vihinen-Ranta et al., 2002). Andererseits wurde im N-terminalen Bereich von VP1 das PLA₂ Motiv identifiziert, welches für die erfolgreiche Überführung der viralen DNA in den Zellkern unabdingbar ist (siehe 1.2.2.3.).

Konversion und Replikation. Das virale Genom wird im Zellkern nach einem unidirektionalen Haarnadelmechanismus (*rolling hairpin*) (Tattersall und Ward, 1976; Cotmore, 1995) repliziert und beginnt mit der Umwandlung der einzelsträngigen DNA in eine intermediäre Duplexform. Dieser als Konversion bezeichnete Prozess verläuft in Abhängigkeit zellulärer Faktoren wie Zyklin A und der assoziierten CDK 2 (Cyclin-dependent Kinase 2) (Bashir et al., 2000). Die Expression dieser zellulären Faktoren wird in der späten G1- und frühen S-Phase des Zellzyklus induziert. Parvoviren sind nicht in der Lage aktiv die S-Phase einzuleiten. Demnach verharrt die virale DNA während der mitotischen Phase einer Zelle im Kern bis zum Beginn der nächsten S-Phase. Eine Integration in das Wirtszellgenom wurde bislang nicht nachgewiesen (Richards und Armentrout, 1979). Die intermediäre DNA Duplexform wird zunächst amplifiziert und dient dann einerseits zur Synthese der mRNA und andererseits der Produktion einzelsträngiger Nachkommen-DNA. Während die Konversion unabhängig von viralen Proteinen verläuft, sind die vollständige Transkription der mRNA sowie die Amplifikation der DNA vom viralen NS1 Protein abhängig (Cotmore und Tattersall, 1987; Tullis et al., 1988). *APAR-(autonomous parvovirus associated replication) bodies*, spezifische Strukturen im Zellkern, wurden als Replikationsort der Parvoviren entdeckt. In ihnen akkumulieren grundlegende Komponenten der zellulären Replikationsmaschinerie (Cziepluch et al., 2000; Bashir et al., 2001). Die virale Replikation und die Expression viraler Genprodukte werden zwar erst bei Eintritt der Zelle in die S-Phase induziert (Volter et al., 1980; Cotmore und Tattersall, 1987), sobald jedoch die viralen Nichtstrukturproteine exprimiert werden und sich in der Zelle ansammeln, werden die zelluläre Replikation und der Zellzyklus in der späten S-Phase blockiert (Hardt et al., 1983; Cotmore und Tattersall, 1987; Op De Beeck et al., 1995; Op De Beeck und Caillet-Fauquet, 1997; Corbau et al., 1999).

Verpackung von Nachkommenviren und deren Freisetzung. Die amplifizierte virale DNA wird im Zellkern in vorgefertigte Kapside verpackt. Hierzu werden die Strukturuntereinheiten unabhängig voneinander in den Kern transferiert. Durch den regulierten Kerntransport der Kapsidkomponenten wird ihre stöchiometrische

Zusammensetzung zum fertigen Kapsid garantiert (Lombardo *et al.*, 2000). Die NLS-Sequenz im C-terminalen Teil der Kapsidhauptkomponente VP2 sowie posttranslationale Modifikationen (Santaren *et al.*, 1993) sind ausschlaggebend für den VP2 Transport in den Kern. Die Translokation von VP1 wird, abgesehen von der dem VP2 Protein gleichen NLS-Sequenz im C-Terminus, auch durch vier basische Regionen im N-terminalen Teil reguliert (Lombardo *et al.*, 2002). Der Mechanismus des Ausschleusens infektiöser Viruspartikel aus der Zelle ist bisher ungeklärt. Eine im NS2 Protein enthaltene NES (*nuclear export signal*) – Sequenz scheint dabei eine wichtige Rolle im Kernexport der Nachkommenviren zu spielen. Eine direkte Interaktion von NS2 mit neuen Viruspartikeln konnte aber bisher nicht nachgewiesen werden (Eichwald *et al.*, 2002). Durch die Lyse der infizierten Zelle werden neusynthetisierte Viren in den extrazellulären Raum freigesetzt. Ob die Freisetzung der Nachkommenviren auch unabhängig von der beobachteten Zelllyse abläuft ist bislang unklar.

1.3 Onkotropismus und Onkosuppression

Onkolytische Viren besitzen die Eigenschaft selektiv krebsartig veränderte Zellen zu infizieren, in diesen zu replizieren und sie schließlich zu töten (Chiocca, 2002). Normale, nicht krebsartig veränderte Zellen hingegen bleiben verschont. Die präferentielle Replikation dieser Viren in neoplastisch transformierten Zellen, bekannt als Onkotropismus, gewährleistet eine Spezifität, die durch derzeitige konventionellen Krebstherapien nicht gegeben ist. Onkolytische Viren werden somit für die Anwendung als Therapeutika in Betracht gezogen.

Onkolytische Viren können generell in zwei Gruppen unterteilt werden (Everts und van der Poel, 2005). Neben den natürlich vorkommenden onkolytischen Viren, wie den Reoviren, dem Vesiculostomatitis Virus (VSV), *New Castle Disease Virus* (NDV) und den autonomen Parvoviren, wie MVMP, gibt es auch Viren, die erst aufgrund gezielter genetischer Veränderungen onkolytische Eigenschaften erworben haben. Zu dieser Gruppe gehören beispielsweise Adeno-, Herpes Simplex-, Vaccinia- und Influenzaviren.

Der Tropismus natürlich vorkommender onkolytischer Viren beruht im Allgemeinen auf zellulären Veränderungen, welche im Laufe der neoplastischen Transformation durch die Zelle erworben wurden. So ist beispielsweise bekannt, dass für eine

Infektion mit Reoviren oder NDV eine Transformation mit aktiviertem *ras* vorliegen muss (Lorence *et al.*, 1994; Coffey *et al.*, 1998). Diese Voraussetzung ist in einer Vielzahl von Tumoren gegeben.

Die bevorzugte Replikation von MVMP in proliferierenden, wenig differenzierten Zellen (Spalholz und Tattersall, 1983; Cotmore und Tattersall, 1987) erklärt das präferentielle Vorkommen in neoplastischen Zellen und Tumorgewebe (Rommelaere und Cornelis, 1991). Der Mechanismus des MVMP Onkotropismus ist jedoch nicht vollständig geklärt. Er ist mit großer Wahrscheinlichkeit nicht auf das Vorhandensein spezifischer Virusrezeptoren zurückzuführen (Chen *et al.*, 1986; Cornelis *et al.*, 1990; Salome *et al.*, 1990). Bezeichnend ist, dass die Sensitivität einer Zelle für die MVMP Infektion durch den Status ihrer Transformation beeinflusst wird (Cornelis *et al.*, 1988a; Salome *et al.*, 1990; Mousset *et al.*, 1994). So ist, wie für Reoviren und NDV beschrieben, auch für MVMP bekannt, dass eine Transformation von Rattenfibroblasten mit aktivierten *ras* Formen, *v-myc* oder *v-src* diese für die MVMP Infektion sensitivieren kann (Salome *et al.*, 1990; Spegelaere *et al.*, 1991; Fuks *et al.*, 1996). Bei vielen Onkogenen handelt es sich um Transkriptionsfaktoren oder in den Zellzyklus involvierte Proteine. Deshalb kann auch die Abhängigkeit der viralen Genexpression und Replikationsmaschinerie von zellulären Faktoren, die in normalen Zellen nicht oder nicht in erforderlicher Menge zur Verfügung stehen, Auswirkungen auf den Onkotropismus von MVMP haben (Rhode, 1973; Tattersall und Bratton, 1983; Cornelis *et al.*, 2004). Insbesondere für die initialen Schritte der viralen Replikation besteht eine starke Abhängigkeit von Faktoren die spezifisch während der S-Phase des Zellzyklus in Tumorzellen angereichert vorliegen (Deleu *et al.*, 1998; Deleu *et al.*, 1999; Bashir *et al.*, 2000).

Die onkosuppressive Aktivität eines Virus ist definiert durch seine Fähigkeit die Entwicklung spontaner, chemisch oder viral induzierter Tumoren zu inhibieren (Rommelaere und Cornelis, 1991). Für viele autonome Parvoviren, wie CPV, KRV, RPV-1, MPV-1, H-1 und MVM sind in einer großen Anzahl verschiedener Studien, auf welche hier nicht im Detail eingegangen wird, onkosuppressive Aktivitäten beschrieben worden (Cornelis *et al.*, 2004).

Wie auch für H-1 bekannt, verläuft die MVMP Infektion in vielen nicht transformierten Nager- und auch humanen Zellen unauffällig. Hingegen wurden sowohl murine als auch humane, in die Maus und Ratte implantierte, Tumorzellen als Target für die

Infektion durch die Nagerparvoviren H-1 und MVM beschrieben (Guetta *et al.*, 1986; Dupressoir *et al.*, 1989; Rommelaere und Cornelis, 1991; Faisst *et al.*, 1998; Herrero *et al.*, 2004). Der Mechanismus der Onkosuppression dieser Viren ist noch unklar, doch wird vermutet, dass er sowohl die selektive Tötung der Tumorzelle als auch Aktivitäten des Immunsystems involviert (Guetta *et al.*, 1986; McKisic *et al.*, 1996; Cornelis *et al.*, 2004). Auch die Empfänglichkeit der Zelle für den zytotoxischen Effekt des Virus scheint ein wichtiges Kriterium in der Behandlung neoplastischer Zellen mit wildtyp Parvoviren darzustellen (Cornelis *et al.*, 2004).

Die onkolytische Aktivität der Parvoviren kann sich allerdings sehr stark in verschiedenen Tumorzellen unterscheiden und ist oft nicht effizient genug, um das Wachstum von Neoplasien irreversibel zu verhindern (Giese *et al.*, 2002; Cornelis *et al.*, 2004). Durch das gezielte Einbringen zusätzlicher zytotoxischer Komponenten (z.B. Immunstimulantien, Toxine) über parvovirale Vektoren konnte in humanen Tumorzellkulturen die intrinsische Antitumoraktivität des Virus gesteigert werden (Olijslagers *et al.*, 2001; Giese *et al.*, 2002). Die Verwendung solcher Vektoren in *ex vivo* Experimenten erwies sich zum Teil als erfolgreich, was bedeutet, dass die Etablierung und das Wachstum von Tumoren aus frisch in das Tier injizierten Tumorzellen gehemmt werden konnte, wenn diese Zellen zuvor mit dem entsprechenden Parvovirus infiziert wurden (El Bakkouri K., 2000; Haag *et al.*, 2000; Wetzel *et al.*, 2001; Giese *et al.*, 2002; El Bakkouri *et al.*, 2005). Es muss aber betont werden, dass die Sensitivität einer Zelllinie für die Infektion mit Parvoviren *in vitro* nicht immer bedeutet, dass es sich damit auch um ein geeignetes *in vivo* Modell handelt (Rommelaere und Cornelis, 2001; Giese *et al.*, 2002; Cornelis *et al.*, 2004).

Die zellulären Mechanismen der Parvovirus induzierten Zytotoxizität sind derzeit Gegenstand intensiver Untersuchungen und werden am Beispiel des autonomen Parvovirus MVMp im Folgenden ausführlich beschrieben.

1.3.1 MVMp vermittelte Zytotoxizität

Die Sensitivität neoplastisch transformierter Zellen für die MVMp induzierte Zytotoxizität *in vitro* wird nicht nur durch den Transformationsstatus der Zelle beeinflusst (Legrand *et al.*, 1992; Mousset *et al.*, 1994), sondern auch durch den Umfang der Expression viraler Proteine bedingt (Cornelis *et al.*, 1988b; Van Hille *et al.*, 1989; Cornelis *et al.*, 1990). Interessanterweise konnte in

Transfektionsversuchen gezeigt werden, dass allein die Expression des MVMP NS1 Proteins zytotoxische Effekte auslöst (Brandenburger *et al.*, 1990; Caillet-Fauquet *et al.*, 1990; Corbau *et al.*, 2000). Diese äußern sich wahrscheinlich als Folge verschiedener Funktionen und Eigenschaften des Proteins (Corbau *et al.*, 2000; Rommelaere und Cornelis, 2001) und führen zu gravierenden Veränderungen in der Zelle. Zu nennen sind hierbei die Inhibition der Synthese zellulärer Makromoleküle (Cotmore und Tattersall, 1987), der mitotische Zellzyklusarrest (Op De Beeck *et al.*, 1995; Op De Beeck *et al.*, 2001), Chromatin-Doppelstrangbrüche (Op De Beeck und Caillet-Fauquet, 1997), die inhibitorische und stimulatorische Transaktivierung zellulärer und viraler Promotoren (siehe 1.2.1), sowie die funktionelle Beeinträchtigung zellulärer Proteine (Anouja *et al.*, 1997; Nüesch *et al.*, 2005). Ein Teil dieser NS1 Aktivitäten wird durch transformationsassoziierte posttranslationale Modifikationen des Proteins koordiniert (Rommelaere und Cornelis, 1991). Insbesondere zeitlich distinkte Phosphorylierungsereignisse sind hier von Bedeutung (Nüesch *et al.*, 1998; Corbau *et al.*, 2000; Daeffler *et al.*, 2003). NS1 wurde somit als die virale Hauptkomponente der MVMP induzierten Zytotoxizität betrachtet. Neueste Ergebnisse aus Versuchen mit rekombinanten MVMP Viren, deren Kapsidprotein-kodierende Sequenz, durch die eines Transgens ersetzt wurde, deuten allerdings daraufhin, dass nach der MVMP Infektion exprimiertes NS1 nicht der alleinige Effektor der schließlich eintretenden Zelllyse sein kann (Lang *et al.*, 2005).

Abgesehen von den beschriebenen pathologischen Veränderungen in der Zelle, kann zu einem späten Zeitpunkt der MVMP Infektion die Lyse der Zelle beobachtet werden. Während der zuvor verwendete Begriff der Onkolyse auf die Tötung neoplastisch transformierter Zellen im allgemeinen zu beziehen ist, bezieht sich der Begriff der Zelllyse in der vorliegenden Arbeit auf den MVMP induzierten nekrotischen Zelltod. Die Lyse der Zelle ist durch eine Zerstörung der Plasmamembran, den Verlust der Zellintegrität sowie die Ausschüttung zytoplasmatischer Zellbestandteile (Pompeia *et al.*, 2003) charakterisiert.

Sämtliche oben benannte zytotoxische Effekte waren und sind Gegenstand einer Vielzahl an Untersuchungen. Der Mechanismus der eigentlichen Lyse MVMP infizierter Zellen ist jedoch bisher nicht erforscht. Es ist sehr wahrscheinlich, dass auch dieser Abschnitt des viralen Infektionszyklus durch Interaktionen viraler mit zellulären Faktoren gekennzeichnet ist. Auf der Suche nach möglichen

Schlüsseldeterminanten der virusinduzierten Zellyse, wurden in der vorliegenden Arbeit Phospholipase A₂ Enzyme als Kandidaten in Betracht gezogen. Zum einen sind sie als Effektoren pathologischer Membranveränderungen und der Zellyse bekannt, zum anderen verfügt MVMP im Kapsidprotein VP1 selbst über ein PLA₂ Motiv (siehe 1.2.2.3).

1.4 Die Superfamilie der Phospholipasen A₂

Phospholipasen (PL) stellen eine sehr große und vielfältige Enzymgruppe dar. Angefangen bei der Synthese und Erneuerung von Membranen bis hin zur Bildung wichtiger Signalmoleküle haben sie vielfältige biologische Funktionen, die alle samt auf der hydrolytischen Spaltung von Glycerophospholipiden beruhen. Hinsichtlich der

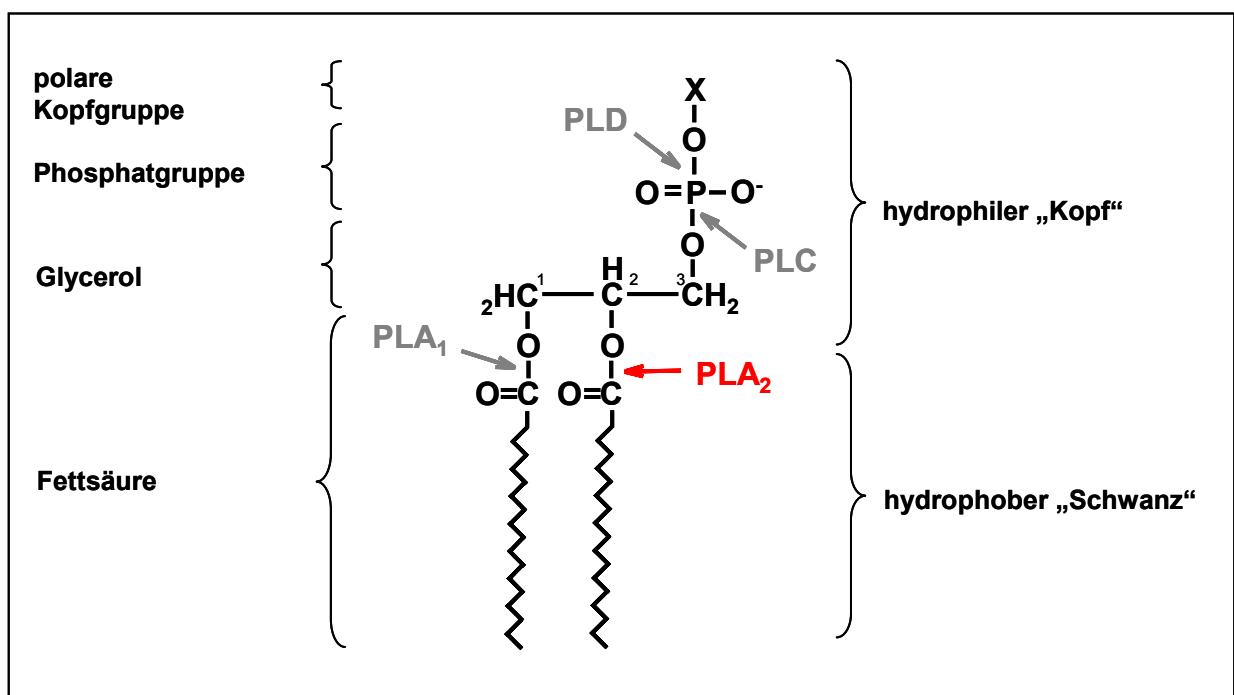


Abb. 1-5: Struktur von Membranglycerophospholipiden und Positionen der hydrolytischen Spaltung durch Phospholipasen (PL).

Membranphospholipide sind amphiphile Moleküle. Zwei von drei Hydroxylgruppen des Glycerols sind mit Fettsäureketten verestert. Dieser Teil des Phospholipids wird auch als hydrophober „Schwanz“ bezeichnet. Die dritte Hydroxylgruppe des Glycerols ist mit einem Phosphatrest verestert, der wiederum an ein weiteres hydrophiles Molekül (hier mit X gekennzeichnet) gebunden ist. Dieser Teil des Phospholipids wird auch hydrophiler „Kopf“ genannt. Die Phospholipidspaltung durch PLA₁ und PLA₂ Enzyme erfolgt an den jeweiligen Esterbindungen der Positionen *sn*-1 und *sn*-2 (*sn*, stereospezifische Nummerierung). PLC katalysiert die Hydrolyse der Bindung zwischen Glycerol und dem Phosphat. PLD entfernt die polare Kopfgruppe des Lipids. PLB Enzyme spalten sowohl an Position *sn*-1 als auch *sn*-2 (nicht gezeigt). Die Pfeile deuten auf die jeweilige Angriffsstelle der Phospholipase im Substrat.

hydrolysierten Position im Substrat werden die Phospholipasen in vier Klassen eingeteilt: PLA (PLA₁ und PLA₂), PLB, PLC und PLD. Abb. 1-5 veranschaulicht schematisch den Aufbau der Membranphospholipide und die Angriffsstelle der jeweiligen Phospholipase.

Phospholipasen A₂ (PLA₂) bilden aufgrund ihrer hohen Diversität eine Superfamilie (Dennis, 1997; Six und Dennis, 2000; Murakami und Kudo, 2002; Kudo, 2004). Sie katalysieren vorzugsweise die Hydrolyse der zentralen *sn*-2 (*sn*, stereospezifische Nummerierung) Esterbindung in Phospholipiden. Diese Spaltung führt zur Produktion von freien Fettsäuren und Lysophospholipiden. In pathophysiologischen Prozessen ist die Freisetzung von Arachidonsäure (AA; 5-,8-,12-,15-Eicosatetraensäure) von besonderer Wichtigkeit. AA ist zum einen selbst ein wichtiges Signalmolekül, dient aber andererseits auch als Substrat für die Synthese weiterer bioaktiver Verbindungen durch nachgeschaltete metabolische Enzyme, wie Cyclooxygenasen (COX), Lipoxygenasen (LOX) und Cytochrom-P450-Epoxygenasen. Infolge dieser Umwandlung entstehen unter anderem Prostaglandine (PG) und Leukotriene (LT), die vor allem als Entzündungsmediatoren eine sehr wichtige Rolle spielen. Das zweite Produkt der Phospholipidhydrolyse, die Lysophospholipide, sind, wie der Name andeutet, in biologischen Membranen als Detergens aktiv, fungieren aber ebenfalls als Vorläufer für Signalmoleküle wie z.B. PAF (*platelet-activating factor*). Somit können PLA₂ durch die Beeinflussung nachgeordneter Faktoren die Weiterleitung vieler Signale regulieren. Des Weiteren repräsentieren PLA₂ durch die Beteiligung an generellen Membranumbildungen eine wesentliche Komponente in der Regulation der zellulären Lipidhomöostase.

Unabhängig von ihrer großen Bedeutung als Bestandteil von Schlangen- und Insektengiften, die unter anderem neuro- und kardiotoxische Wirkung haben, wurden bislang 20 verschiedene Enzyme der PLA₂ Superfamilie in Säugerzellen identifiziert. Bis zum Ende der achtziger Jahre war nur ein einziges PLA₂ Enzym identifiziert, welches in großer Menge im Verdauungssaft des Pankreas vorkommt. Man nahm daher an, dass es hier ausschließlich zur Verarbeitung der Nahrungsfette beiträgt (Arnesjo *et al.*, 1967). Diese pankreatische PLA₂ wird in der heutigen Nomenklatur mit sPLA₂-IB bezeichnet. 1989 folgte die Entdeckung einer weiteren PLA₂ in sekretorischen Granula von Entzündungszellen (Seilhamer *et al.*, 1989). Diese, besonders in der Gelenkflüssigkeit bei Rheumatoider Arthritis angereicherte

synoviale PLA₂, wird als sPLA₂-IIA bezeichnet. Mit dem Beginn der neunziger Jahre und der Aufklärung des humanen und murinen Genoms begann eine neue Ära in der PLA₂-Enzym Forschung. Seither ist die Anzahl an neu klonierten und charakterisierten PLA₂ Subtypen erheblich gewachsen. Die Superfamilie der PLA₂ wird, abhängig von Größe, Ca²⁺-Abhängigkeit, sowie biochemischer Eigenschaften und Funktionen in vier Gruppen unterteilt: die zytosolischen PLA₂ (cPLA₂), die sekretorischen PLA₂ (sPLA₂), die Ca²⁺-unabhängige PLA₂ (iPLA₂) und die *platelet-activating factor* Acetylhydrolasen (PAF-AH). Letztere nehmen eine Außenseiterstellung ein, da ihnen nicht Phospholipide, sondern ausschließlich PAF und oxidierte Phospholipide als Substrat dienen. Während sPLA₂ in intrazellulären Vesikeln deponiert oder nach Stimulation von Zellen exprimiert und anschließend über Exozytose sezerniert werden, handelt es sich sowohl bei cPLA₂ als auch iPLA₂

Tab. 1-1: Klassifikation der Säuger PLA₂ Enzyme (nach Dennis) (abgewandelt aus: Murakami *et al.*, 2002).

Die dargestellten Gruppen der PLA₂ Enzyme (sPLA₂, sekretorische PLA₂; cPLA₂, zytosolische PLA₂; iPLA₂, Ca²⁺-unabhängige PLA₂, PAF-AH, PAF-Acetylhydrolasen) werden wiederum in verschiedene Enzymsubtypen unterteilt, die sich hinsichtlich ihrer Größe und der Abhängigkeit von der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration unterscheiden.

Gruppe	Subtyp	alternative Bezeichnung	Größe in kDa	Ca ²⁺ -Abhängigkeit
sPLA₂	IB	pankreatische PLA ₂ synoviale PLA ₂	14	mM
	IIA		14	mM
	IIC		15	mM
	IID		14	mM
	IIE		14	mM
	IIF		16	mM
	V		14	mM
	X		14	mM
	III		55	mM
	XII		19	mM
cPLA₂	IVA	cPLA ₂ α	85	nM-μM
	IVB	cPLA ₂ β	110	nM-μM
	IVC	cPLA ₂ γ	110	keine
iPLA₂	VIA	iPLA ₂ β	85-88	keine
	VIB	iPLA ₂ γ	90	keine
PAF-AH	VIIA		45	keine
	VIIIB		40	keine
	VIIIA		30	keine
	VIIIB		30	keine

um rein intrazelluläre Enzyme. Inaktive cPLA₂ liegen im Zytosol vor und wandern nach der Aktivierung zu Membrankompartimenten. iPLA₂ sind sowohl im Zytoplasma als auch in Membranfraktionen vorhanden. Tab. 1-1 gibt einen Überblick über den enormen Umfang der derzeit beschriebenen Subtypen unter den PLA₂ Säugerenzymen. Im Folgenden wird nicht auf die ganz speziellen Eigenschaften eines jeden einzelnen Enzyms eingegangen, viel mehr sollen wesentliche Charakteristika der klassischen PLA₂ betont werden. Die Regulation der PLA₂ involviert eine große Vielzahl zellulärer Faktoren und wird durch stimulusabhängige Signalwege und auch die jeweilige gegenseitige Beeinflussungen der verschiedenen Enzyme bedingt.

1.4.1 Sekretorische PLA₂ (sPLA₂)

Insgesamt sind bisher 10 katalytisch aktive sPLA₂ Enzyme in Säugetieren (IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, X, XIIA) identifiziert worden (Murakami und Kudo, 2001; Kudo und Murakami, 2002). Sie haben ein Molekulargewicht von 14-18 kDa (Ausnahme: sPLA₂-III mit 55 kDa) und zeichnen sich durch mehrere Disulfidbrücken aus, welche ihnen eine hohe Stabilität gegen die Degradation in extrazellulären Flüssigkeiten verleihen. Von allen sPLA₂ Enzymen sind sich die Vertreter der Gruppen I, II, V und X am ähnlichsten, da sie eine einheitliche Ca²⁺-Bindungsstelle, die gleiche katalytisch aktive Domäne und sechs identische Disulfidbrücken aufweisen (Murakami und Kudo, 2004b). Einheitliche Histidin- und Aspartatreste stabilisieren in diesen Enzymen die präzise Ca²⁺- und Substratbindung. Die Enzyme der Subtypen sPLA₂-III und -XIIA teilen Homologien zu Vertretern der anderen Subtypen ausschließlich hinsichtlich der Ca²⁺-Bindungs- und der katalytischen Domäne. Die Ca²⁺-Abhängigkeit der sPLA₂ variiert im micro- bis millimolaren Konzentrationsbereich. Millimolare Ca²⁺-Konzentrationen liegen vor allem in extrazellulären Flüssigkeiten vor, wo auch die von diesen hohen Ca²⁺-Konzentrationen abhängigen sPLA₂ vorkommen, wie z.B. die sPLA₂-IIA. Dagegen treten mikromolare Ca²⁺-Konzentrationen in intrazellulären Kompartimenten auf, und in der Tat lassen sich dort auch sPLA₂-Subtypen detektieren (Murakami und Kudo, 2004b). Dies deutet bereits an, dass nicht alle sPLA₂ sezerniert werden, sondern, dass sie auch intrazelluläre Aktivitäten und Funktionen entfalten können. Der Wissensstand hierzu ist jedoch noch sehr rudimentär.

Die Spaltung von Phospholipiden durch sPLA₂ erfolgt ohne strenge Selektivität für bestimmte Fettsäuren (Kudo *et al.*, 1993; Dennis, 1994), zeichnet sich aber durch die bevorzugte Hydrolyse anionischer Phospholipide, wie beispielsweise Phosphatidylserin, Phosphatidylglycerol und Phosphatidylethanolamin (Bezzine *et al.*, 2002; Murakami und Kudo, 2004b) oder aber des neutralen Phosphatidylcholins aus (Bezzine *et al.*, 2000; Murakami und Kudo, 2003). Durch ihre eigene kationische Ladung, können die sPLA₂-Subtypen IIA, IID und V gut an anionische Heparansulfatproteoglykane (HSPG) binden (Murakami *et al.*, 1999b; Murakami *et al.*, 2001). Die Spezifität der sPLA₂ für bestimmte polare Kopfgruppen der Phospholipide und die Eigenschaft einiger Subtypen mit HSPG assoziieren zu können, kann wesentlichen Einfluss auf ihre biologische Funktion haben, welche allerdings für die Subtypen im Einzelnen nur zum Teil bekannt ist (Murakami und Kudo, 2004b).

Abgesehen von der wesentlichen Funktion der sPLA₂ Enzyme, Lipidmediatoren zu produzieren, sind sie in eine Vielzahl physiologischer und pathologischer Ereignisse involviert. Biologisch relevante sPLA₂-Funktionen sind beispielsweise die Beteiligung am Metabolismus von Lipoproteinen im Zusammenhang mit Atherosklerose (Murakami und Kudo, 2003), die Regulation der angeborenen Immunität gegen bakterielle Infektionen (Buckland und Wilton, 2000), die Beeinflussung der Permeabilitätsbarriere (Mao-Qiang *et al.*, 1996) und der Eicosanoidbiosynthese (Haas *et al.*, 2005) in der Haut, die Beteiligung an der Acrosomreaktion von Spermien mit der Zellmembran von Oozyten (Patrat *et al.*, 2000) sowie die Stimulation der Chemokinexpression und -produktion in Lungenendothelzellen (Beck *et al.*, 2003a). Prinzipiell geht man davon aus, dass die meisten sPLA₂ vor ihrer eigentlichen hydrolytischen Aktivität an zellulären Membranen, zunächst von der Zelle sezerniert werden. In Abhängigkeit vom Enzymsubtyp, der betrachteten Zelllinie und dem entsprechenden Stimulus, wird die sPLA₂ Aktivität durch die mögliche Interaktion mit extrazellulären und membranassoziierten Faktoren stark beeinflusst (Murakami und Kudo, 2004b). Verschiedene Modelle für die Funktionsmöglichkeiten der sPLA₂ werden kontrovers diskutiert (Abb. 1-6). Der sogenannte HSPG-*shuttling pathway* (Abb. 1-6 I) ist allein den stark basischen sPLA₂ Subtypen IIA, IID und IIE, sowie sPLA₂-V vorbehalten, da nur diese eine elektrostatische Interaktion mit den negativ geladenen Heparansulfatketten der

Proteoglykane eingehen können (Murakami *et al.*, 1999b; Murakami *et al.*, 2001). Die Bindung an HSPG, welches an bestimmten Regionen der Membran gehäuft vorkommt, sorgt für eine lokale Anreicherung des Enzyms. Nach Aktivierung der Zelle werden die sPLA₂ beladenen Membrandomänen endozytotisch nach innen abgeschnürt und in den perinukleären Raum transportiert (Kim *et al.*, 2002b). Hier lokalisieren sie dicht neben nachgeordneten Enzymen, wie COX und LOX, welchen sie dadurch unmittelbar freigesetzte AA zur Verfügung stellen können. Allerdings konnte die präzise Lokalisation dieser reinternalisierten sPLA₂ bisher nicht bestimmt werden. Widersprüchlich scheint außerdem, dass in manchen Fällen eine Inaktivierung der an HSPG gebundenen sPLA₂ durch lysosomale Degradation beobachtet werden konnte (Kim *et al.*, 2001).

Nur wenige sPLA₂ Subtypen sind in der Lage, Phosphatidylcholin zu hydrolysieren, welches sich in großer Menge an der Außenseite der Plasmamembran befindet (Bezzine *et al.*, 2000; Murakami und Kudo, 2004a) (Abb. 1-6 II). sPLA₂-X hat von allen sPLA₂ die höchste Affinität für Phosphatidylcholin und setzt somit den größten Anteil an AA frei, wie für adhärente Zellen gezeigt wurde (Hanasaki *et al.*, 1999; Bezzine *et al.*, 2000). sPLA₂-X und -IIIF agieren unabhängig von einer Bindung an HSPG (Murakami *et al.*, 1999a; Murakami und Kudo, 2004b). Die Subtypen V und III hingegen können über beide Wege ihre hydrolytische Funktion entfalten (Kim *et al.*, 2001; Murakami und Kudo, 2004b). Andere sPLA₂ können Membranphospholipide erst spalten, nachdem Zellen dem Einfluss proinflammatorischer Stimuli ausgesetzt waren, welche Perturbationen an der Plasmamembran auslösen. Erst diese Perturbationen machen die Membran für sPLA₂ zugänglich (Atsumi *et al.*, 1997; Murakami *et al.*, 1999a; Murakami und Kudo, 2004b).

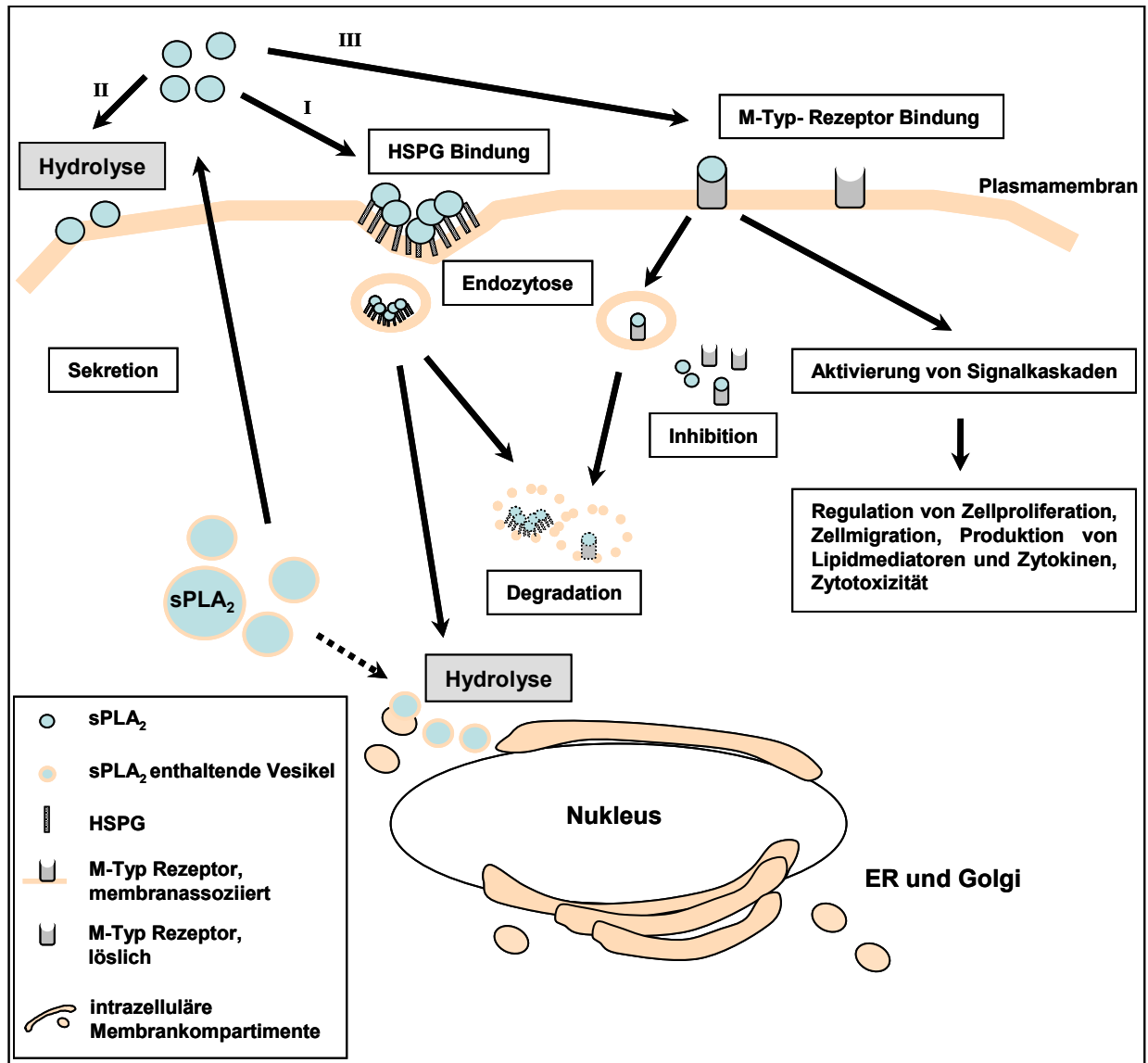


Abb. 1-6: Schematische Darstellung möglicher sPLA₂ Funktionsmechanismen.

Nach Aktivierung der Zelle wird intrazellulär gelagerte sPLA₂ nach außen sezerniert. Abhängig vom sPLA₂ Subtyp erfolgt an der Plasmamembran direkt die Hydrolyse von Membranphospholipiden (vor allem Phosphatidylcholin) (II) oder die Bindung an Heparansulfatproteoglykane (HSPG) (I) oder den M-Typ Rezeptor (III). Die Bindung an HSPG führt zur lokalen Anreicherung des Enzyms und zur endozytotischen Reinternalisierung. In Kolokalisation mit nachgeschalteten metabolischen Enzymen (nicht gezeigt) entfaltet die sPLA₂ in diesem Fall ihre hydrolytische Aktivität an intrazellulären Membranen. Konträr zu diesem, HSPG-shuttling pathway benannten, Mechanismus der sPLA₂ Aktivität steht die Beobachtung, dass dieser Mechanismus auch der Beseitigung überschüssigen Enzyms dienen kann. Auch die Assoziation sezernierter sPLA₂ an die membranständige Form des M-Typ Rezeptors kann eine Reinternalisierung durch Endozytose und somit die Degeneration des Enzyms zur Folge haben. Bindet sPLA₂ diesen Rezeptor allerdings als Ligand kommt es gegebenenfalls zur Aktivierung verschiedener Signalkaskaden. Über diesen Funktionsmechanismus können sPLA₂ verschiedene biologische Prozesse der Zelle regulieren. Der M-Typ Rezeptor kann intra- und extrazellulär auch in löslicher Form vorliegen. Die Assoziation von sPLA₂ mit der löslichen Form inhibiert das Enzym in seiner Aktivität. Kürzlich wurde gezeigt, dass bestimmte sPLA₂ Subtypen (vergleiche Text) ohne vorhergehende Sekretion, intrazellulär hydrolytische Aktivität haben können (unterbrochener Pfeil).

Die vorhergehenden Ausführungen machen deutlich, dass die Aktivität der sPLA₂, in Abhängigkeit vom Subtyp des Enzyms und dem betrachteten Zelltyp, durch eine enorme Vielseitigkeit charakterisiert ist. Die einzelnen geschilderten Mechanismen der sPLA₂ Funktion sollten demnach nicht als absolut betrachtet werden. Dem Dogma, dass einer sPLA₂ Aktivität auf jeden Fall eine Sekretion des Enzyms vorausgehen muss (Murakami und Kudo, 2004a), wurde kürzlich entgegengesetzt, dass in stimulierten Keratinozyten für die katalytische Aktivität der sPLAs Subtypen IIA und X eine vorhergehende Sekretion nicht zwingend erforderlich ist (Mounier *et al.*, 2004) (Abb. 1-6, unterbrochener Pfeil). Dass die Möglichkeit dieser Funktionsweise prinzipiell besteht, wurde zuvor bereits in Bezug auf die Ca²⁺-Abhängigkeit der sPLA₂ erwähnt.

Die meisten der beschriebenen sPLA₂-Funktionen werden auf ihre enzymatische Aktivität, die Hydrolyse von Membranphospholipiden, zurückgeführt. Darüber hinaus konnte unter Verwendung katalytisch inaktiver sPLA₂ Mutanten beobachtet werden, dass sie, unabhängig von ihrer Aktivität, als Liganden für spezifische Rezeptoren dienen können, um verschiedene Signalwege zu beeinflussen. sPLA₂ haben somit z.B. Einfluss auf die Zellproliferation, Zellmigration, die Ausschüttung von Hormonen oder Lipidmediatoren sowie drastische Plasmamembranumordnungen und somit auch den Zelltod (Kishino *et al.*, 1995; Atsumi *et al.*, 1997; Vadas, 1997; Murakami *et al.*, 1999a; Fonteh *et al.*, 2001; Silliman *et al.*, 2002; Yagami *et al.*, 2002a; Yagami *et al.*, 2002b; Granata *et al.*, 2003; Park *et al.*, 2003; Triggiani *et al.*, 2003; Granata *et al.*, 2005). Der bisher am besten charakterisierte sPLA₂ Rezeptor ist der M-Typ Rezeptor (Lambeau *et al.*, 1990) (Abb. 1-6 III), der zirkulierend sowohl als membranständiger als auch als löslicher Rezeptor vorliegen kann (Lambeau und Lazdunski, 1999), wobei die Assoziation der sPLA₂ mit extra- oder intrazellulär vorliegenden löslichen M-Typ Rezeptoren ihre Aktivität inhibiert (Lambeau und Lazdunski, 1999). Die Interaktion zwischen dem membranständigen M-Typ Rezeptor und sPLA₂ ist streng speziesspezifisch und außerdem abhängig vom sPLA₂ Subtyp (Lambeau und Lazdunski, 1999). Die Bindung von extrazellulärer sPLA₂ an den membranständigen Rezeptor kann zur endozytotischen Aufnahme des Enzyms führen (Hanasaki und Arita, 1992; Ancian *et al.*, 1995; Zvaritch *et al.*, 1996). Im Anschluss kann es dann entweder zur lysosomalen Degradation und somit dem Abbau überschüssiger Enzyme kommen (Hanasaki und Arita, 1999) oder aber die

gebundene sPLA₂ wird intrazellulär vom Rezeptor wieder freigesetzt und lokalisiert in unmittelbarer Nähe nachgeschalteter Faktoren an intrazellulären Membrankompartimenten (Fayard *et al.*, 1998; Balboa *et al.*, 2003). Eine weitere diskutierte Folge der sPLA₂ Bindung an membranassoziierte Rezeptoren ist die Freisetzung von Signaltransmittern wie beispielsweise TNF α und IL-6 (Arita *et al.*, 1991; Kundu und Mukherjee, 1997; Gambero *et al.*, 2004; Granata *et al.*, 2005).

1.4.2 Zytosolische PLA₂ (cPLA₂)

cPLA₂ werden aufgrund ihres im Vergleich zu sPLA₂ hohen Molekulargewichts von ca. 85 kDa auch als *high molecular weight PLA₂* bezeichnet. Sie werden durch extrazelluläre Stimuli wie Zytokine, Hormone, Neurotransmitter, Endotoxine, Mitogene und reaktiven Sauerstoff aktiviert (Clark *et al.*, 1995). cPLA₂ spalten spezifisch AA aus Membranphospholipiden und katalysieren damit den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt in der schnellen Freisetzung von AA und der nachgeschalteten Biosynthese von Eicosanoiden. Bisher sind in Säugern vier strukturelle Isoformen der cPLA₂ (α , β , γ und δ) beschrieben worden, die sich hinsichtlich der zwei katalytisch wichtigen Domänen gleichen (Hirabayashi *et al.*, 2004). cPLA₂ α und cPLA₂ β verfügen über eine N-terminale Domäne (C2), welche für die Ca²⁺-abhängige Assoziation des Enzyms mit seinem Substrat verantwortlich ist (Nalefski *et al.*, 1994; Gijon *et al.*, 1999). cPLA₂ α zeichnet sich durch eine hohe Selektivität für Glycerophospholipide aus, die an Position *sn*-2 Arachidonsäure enthalten (Leslie *et al.*, 1988; Clark *et al.*, 1995). Dies erweckte großes Interesse an der Erforschung der cPLA₂ α und macht sie heute zur am besten charakterisierten cPLA₂ Isoform. Die folgenden Ausführungen beziehen sich daher auf cPLA₂ α .

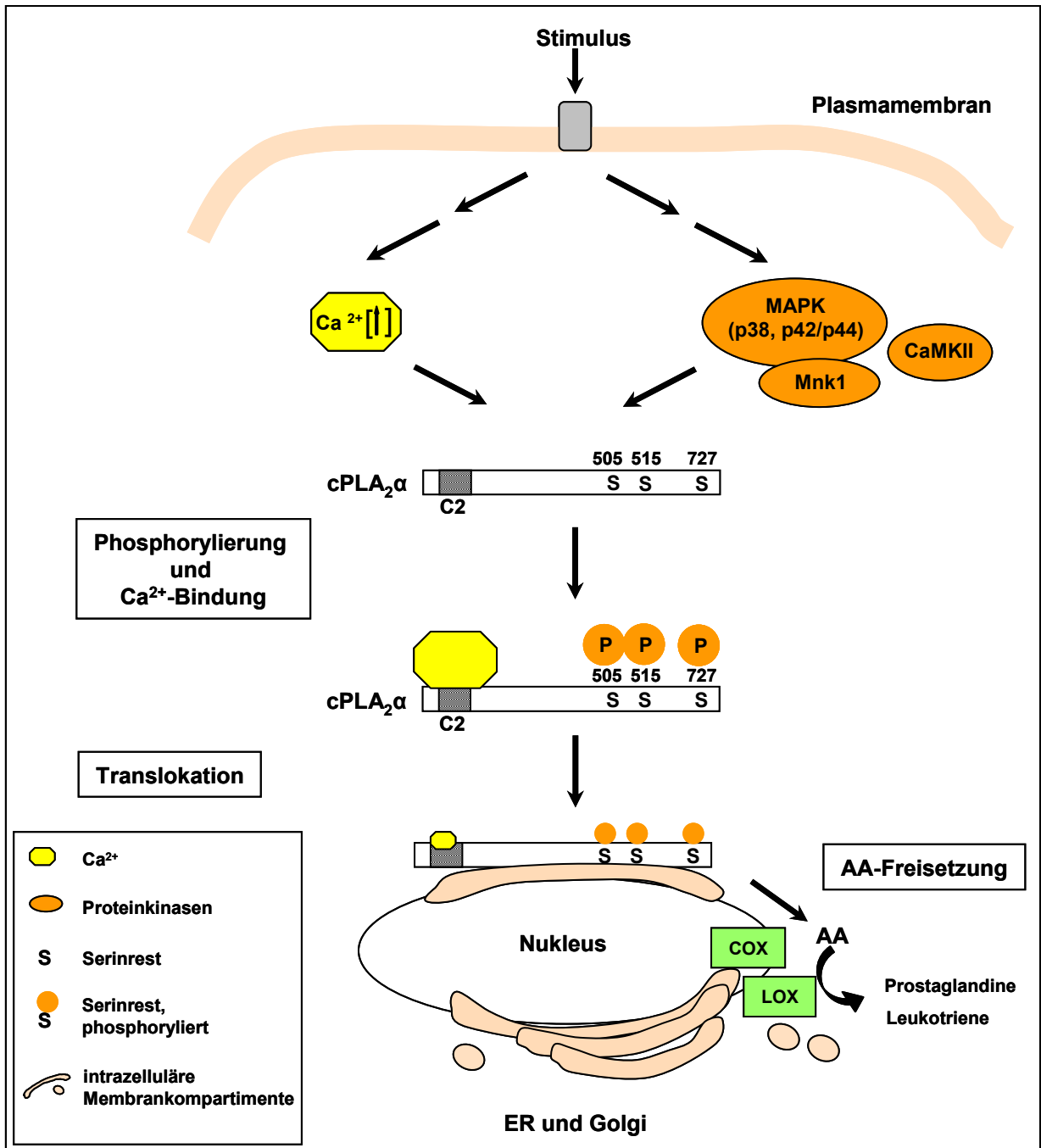


Abb. 1-7: Schematische Darstellung der Aktivierung von cPLA₂α.

Durch stimulusinduzierte Rezeptoraktivierung kommt es zur Mobilisierung von zytoplasmatischem Ca²⁺. Ein Anstieg der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und die Bindung von Ca²⁺ an cPLA₂α führt zur Translokation des Enzyms vom Zytoplasma zu perinukleären Membrankompartimenten, beispielsweise ER (Endoplasmatisches Retikulum) und Golgi-Apparat, wo sich metabolische Enzyme wie COX und LOX befinden. Die initiale Rezeptorstimulation führt auch zur Aktivierung von p38 und p42/p44 MAPK (*Map Kinase*), sowie MAPK-aktivierten Proteinkinasen, wie Mnk1 (*MAPK interacting kinase I*). Diese phosphorylieren cPLA₂α an den Serinresten 505 und 727, wobei beide Phosphorylierungsereignisse für eine vollständige Aktivierung der cPLA₂α essentiell sind. Eine Phosphorylierung von cPLA₂α an Serinrest 515 durch CaMKII (*Ca²⁺/Calmodulin-activated kinase II*) findet nur bedingt statt. Durch cPLA₂α freigesetzte AA dient als Substrat für die Synthese von Eicosanoiden wie zum Beispiel Prostaglandinen und Leukotrienen.

Die Regulation der cPLA₂α erfolgt auf verschiedenen Ebenen (Abb. 1-7), die sowohl stimulus- als auch zelltypabhängig sind (Hirabayashi *et al.*, 2004). Ein wichtiger Faktor ist hierbei die Ca²⁺-Konzentration. Die Freisetzung von Ca²⁺ erfolgt nach stimulusinduzierter Rezeptoraktivierung und Phosphatidylinositol-2-phosphat (PIP₂) Produktion (Ambudkar, 2004). Die erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentration führt zu einer Translokation der im Zytoplasma inaktiv vorliegenden cPLA₂ zu Membrankompartimenten des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgi-Apparates und der Kernmembran (Glover *et al.*, 1995; Schievella *et al.*, 1995; Gijon *et al.*, 2000; Evans *et al.*, 2001; Evans *et al.*, 2004; Evans und Leslie, 2004), wo sie mit nachgeordneten Enzymen wie COX und LOX zusammentrifft. Die Ca²⁺-Bindung an die C2 Domäne der cPLA₂ bewirkt elektrostatische Veränderungen im Enzym, wodurch einerseits hydrophobe Aminosäurereste in die Membran eindringen (Davletov *et al.*, 1998; Ball *et al.*, 1999; Bittova *et al.*, 1999) und wodurch sich andererseits auch die Substratpräferenz zugunsten von Phosphatidylcholin ändert (Gerber *et al.*, 2001). Da sowohl die subzelluläre Lokalisation von cPLA₂α als auch die Präferenz für Phosphatidylcholin durch die selben Mutationen in der C2 Domäne beeinflusst werden können, geht man davon aus, dass die bevorzugte Translokation zu perinukleären Membrankompartimenten in der Präferenz für diese Phospholipide begründet liegt (Stahelin *et al.*, 2003; Hirabayashi *et al.*, 2004). Die intrinsische enzymatische Aktivität von cPLA₂α wird in den meisten agonistinduzierten Fällen auch durch Phosphorylierungen an definierten Serinen in der katalytischen Domäne reguliert. Je nach Stimulus und Zelltyp kann die cPLA₂α an Serin 515 (Ser515) durch die CaMKII (Ca²⁺ / Calmodulin-dependent Kinase II) (Muthalif *et al.*, 2001), an Ser727 durch die Mnk1 (MAPK-interacting Kinase 1) (Muthalif *et al.*, 2001) und vor allem an Ser505 durch p38 und p44 / p42 MAPK (Map Kinase) (Lin *et al.*, 1993; Nemenoff *et al.*, 1993; Gijon und Leslie, 1999) phosphoryliert werden. Diese Phosphorylierungsereignisse erhöhen die enzymatische Aktivität der cPLA₂α um das zwei- bis dreifache (Hirabayashi *et al.*, 2004). Die detaillierte Funktion der Phosphorylierung an den genannten Positionen und den Zusammenhang mit der Ca²⁺-Abhängigkeit ist noch nicht vollständig aufgeklärt.

Interaktionen mit verschiedenen zellulären Faktoren können sowohl unterstützend als auch inhibierend zur funktionellen Regulation der cPLA₂ beitragen. Beispielsweise stabilisiert die Bindung der cPLA₂α C2 Domäne mit der

Zytoskelettkomponente Vimentin (Nakatani *et al.*, 2000), welches in der perinukleären Region der Zelle lokalisiert ist, die Assoziation des Enzyms mit der Zielmembran. Eine Lokalisation von cPLA₂α an der Plasmamembran wurde bisher nur in aktivierten Phagozyten beobachtet (Shmelzer *et al.*, 2003). In diesem Fall assoziiert das Enzym mit der membranständigen NADPH Oxidase. Einen inhibierenden Effekt haben hingegen Interaktionen mit Vertretern der Annexin Familie (Kim *et al.*, 2001) sowie die Bindung und Spaltung der cPLA₂ durch die generellen Effektoren der Apoptose, Caspase-1,-3 und -8 (Adam-Klages *et al.*, 1998; Atsumi *et al.*, 1998; Luschen *et al.*, 1998).

Zur Charakterisierung physiologischer cPLA₂ Funktionen *in vivo* war die Generierung einer cPLA₂α *knock-out* Maus von wesentlicher Relevanz (Murakami und Kudo, 2004a). Untersuchungen an den adulten, cPLA₂-defizienten Mäusen haben ergeben, dass diese morphologisch kaum Unterschiede im Vergleich zu wildtyp Tieren aufweisen (Hirabayashi *et al.*, 2004). Jedoch zeigen diese Tiere eine weitaus größere Resistenz gegenüber schweren entzündlichen Erkrankungen im Gehirn, den Gelenken, den Atmungsorganen und dem Verdauungstrakt (Hirabayashi *et al.*, 2004). Diese Beobachtungen weisen auf eine direkte Beteiligung der cPLA₂α und ihren nachgeschalteten Faktoren in den verschiedenen pathologischen Vorgängen hin. Sie unterstreichen darüber hinaus die außerordentliche Bedeutung der cPLA₂α in der schnellen Bereitstellung von AA für die Biosynthese wichtiger Entzündungsmediatoren (Hirabayashi *et al.*, 2004).

Im Allgemeinen kann man davon ausgehen, dass sämtliche Zelltypen sowohl cPLA₂ als auch mindestens einen sPLA₂ Subtyp exprimieren. Untersuchungen an verschiedenen Zelllinien lassen vermuten, dass sich beide Enzymgruppen gegenseitig positiv regulieren können (Murakami und Kudo, 2004a). Ein so genannter *cross-talk* zwischen cPLA₂ und sPLA₂ wurde bereits in mehreren Zellsystemen beschrieben. So konnte z.B. in einer Makrophagenlinie zwar gezeigt werden, dass die Hauptmenge an AA durch sPLA₂ produziert wird (Balsinde *et al.*, 1999), interessanterweise scheint jedoch die stimulusinduzierte sPLA₂ Aktivität in diesen Zellen stark cPLA₂-abhängig zu sein (Balsinde und Dennis, 1996; Balsinde *et al.*, 1998). Ähnliches wurde auch in Fibroblasten (Kuwata *et al.*, 1998; Kudo und Murakami, 1999; Mounier *et al.*, 2004; Murakami und Kudo, 2004a) sowie

Mesangiumzellen (Han *et al.*, 2003) beschrieben. Andererseits konnte auch der umgekehrte Effekt, nämlich die Stimulation von cPLA₂ durch sPLA₂ Aktivität beispielsweise in Osteoblasten (Kudo und Murakami, 1999) und glomerulären Mesangiumzellen (Huwiler *et al.*, 1997; Beck *et al.*, 2003b) beobachtet werden. cPLA₂ übernimmt in diesen Modellen also eine Schlüsselfunktion in AA abhängigen Signalwegen, selbst wenn sPLA₂ der hauptsächliche Effektor ist (Balsinde *et al.*, 1999).

1.4.3 Ca²⁺-unabhängige PLA₂ (iPLA₂)

Vertreter der Ca²⁺-unabhängigen iPLA₂ Gruppe wurden in unterschiedlichen Spezies und verschiedenen Zelltypen identifiziert (Winstead *et al.*, 2000). Sie umfassen die Phospholipasen des Subtyps VI, und lassen sich weiterhin in die Subtypen VIA und VIB unterteilen. Generell handelt es sich um Proteine mit einem Molekulargewicht von 85-88 kDa, welche über eine identische Lipase-Sequenz (Akiba und Sato, 2004) verfügen. Mehrere Ankyrinmotive spielen möglicherweise eine Rolle bei der Oligomerisierung der iPLA₂. Verschiedene Spleißvarianten der iPLA₂ Subtypen wurden beschrieben, die sich strukturell und funktionell unterscheiden. Unter den verschiedenen Isoformen haben allein iPLA₂ VIA-1 und VIA-2 hydrolytische Phospholipase A₂ Aktivität und sind am besten charakterisiert. Einige dominant-negative iPLA₂ Isoformen haben inhibitorischen Einfluss auf iPLA₂ VIA-1 und VIA-2 (Winstead *et al.*, 2000).

Obwohl die katalytische Aktivität von iPLA₂ Ca²⁺-unabhängig ist, ist die intrazelluläre Ca²⁺ Konzentration an der Regulation des Enzyms beteiligt. Untersuchungen unter Verwendung von Ca²⁺-Blockern sowie spezifischer iPLA₂ Inhibitoren ließen den Schluss zu, dass die Reduzierung intrazellulärer Ca²⁺-Depots in einer Aktivierung von iPLA₂ und der Freisetzung von AA resultierte und dass diese Regulation offenbar mit Ca²⁺-abhängigem Calmodulin in Zusammenhang steht (Akiba und Sato, 2004). In der Tat konnte im C-terminalen Teil des iPLA₂ Proteins eine durch Ca²⁺-regulierte Calmodulin-Bindestelle identifiziert werden (Jenkins *et al.*, 2001). Zusätzlich scheinen auch Vertreter der Proteinkinase C Familie in der stimulusinduzierten Aktivierung von iPLA₂ eine Rolle zu spielen (Akiba und Sato, 2004), wie in Monozyten und Makrophagen beobachtet wurde (Akiba *et al.*, 2002; Steer *et al.*, 2002).

Die bedeutendste iPLA₂ Funktion besteht in der Organisation und Koordination physiologischer, homöostatischer Membranamordnungen (Balsinde und Dennis, 1997a; Winstead *et al.*, 2000; Akiba und Sato, 2004). Die Spaltung von Phospholipiden durch iPLA₂ in diesem Zusammenhang führt zur Freisetzung und Bereitstellung von Lysophospholipiden, die wiederum für den Einbau freier AA verwendet werden. Abgesehen von dieser Hauptfunktion, ist eine Aktivität der iPLA₂ auch schon in der Agonist-induzierten Freisetzung von AA beschrieben worden. Dies konnte zum Beispiel in Zymosan-stimulierten Granulozyten (Larsson Forsell *et al.*, 1998), in Vasopressin-stimulierten Muskelzellen (Wolf *et al.*, 1997) und in IL-1 β -stimulierten Makrophagen (Balsinde *et al.*, 1997; Balsinde und Dennis, 1997b) beobachtet werden. Weiterhin kann iPLA₂ als Komponente zellulärer Signalkaskaden bei der Apoptose, der Fusion von Vesikeln mit Membranen und der Sekretion von Lysosomen und Zellproliferation fungieren (Akiba und Sato, 2004).

1.4.4 Über die Bedeutung zellulärer PLA₂ in Zellschädigungen und Zelltod

PLA₂ haben große Bedeutung in der Regulation von Signalkaskaden vieler verschiedener physiologischer und pathophysiologischer Prozesse. Letztere können durch eine vollständige Zerstörung von Zellen und Zellverbänden charakterisiert sein, wie zum Beispiel bei neurodegenerativen Veränderungen, Ischämien und Multiorganversagen als Folge einer Sepsis beobachtet wurde (Bonventre, 1997; Farooqui *et al.*, 2004).

Gut erforscht ist die Rolle der PLA₂ in der Apoptose. Während cPLA₂ im Laufe der Fas-induzierten Apoptose durch Caspase-1, -3 oder -8 gespalten und somit inaktiviert wird (Adam-Klages *et al.*, 1998; Atsumi *et al.*, 1998; Luschen *et al.*, 1998), scheint ihre katalytische Aktivität in der TNF α -induzierten Apoptose hingegen in vielen Zelltypen von wesentlicher Bedeutung zu sein (Ilic *et al.*, 1998; Evans *et al.*, 2001). Der detaillierte Mechanismus ist bisher ungeklärt, doch führt eine Caspase-3 Spaltung in diesem Fall nicht zur Hemmung sondern zur Aktivierung des Enzyms (Wissing *et al.*, 1997). Im Gegensatz zu cPLA₂, welche für die Fas-induzierte Apoptose entbehrlich ist, wurde mehrfach berichtet, dass iPLA₂ in verschiedene Signaltransduktionsprozesse sowie Membranamordnungen, bei Fas-induzierter

Apoptose involviert ist (Atsumi *et al.*, 1998; Perez *et al.*, 2004). Die Apoptose ist ein energieaufwendiger Prozess, der im Gegensatz zur Zelllyse nicht mit der Zerstörung der Plasmamembran einhergeht. Im Endstadium der Apoptose werden Bestandteile der sterbenden Zelle vielmehr geordnet in membranumschlossene, auch *apoptotic bodies* genannte, Kompartimente verpackt. Man nimmt an, dass hierfür erforderliche Membranumordnungen, welche die Ausschüttung dieser Kompartimente kontrollieren, durch iPLA₂ reguliert werden (Capper und Marshall, 2001).

Abgesehen von den PLA₂ Funktionen in der Apoptose, postulierten schon Sevanian *et al.* (1988) dass eine langfristige Aktivierung von PLA₂ unter Umständen zu nachhaltigen Membran- und somit Zellschäden führen würde. Diese Aussage wurde darauf begründet, dass die Produkte der Phospholipidhydrolyse, wie freie Fettsäuren und Lysophospholipide, als Vorläufer für proinflammatorisch aktive Metabolite dienen und, dass eine verstärkte Phospholipidhydrolyse den Verlust der Membranintegrität verursachen kann (Sevanian *et al.*, 1988). Insbesondere mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie AA, führen zur Bildung von Superoxiden, welche wiederum die Lipidperoxidation zur Folge haben (Pompeia *et al.*, 2003). Auf der einen Seite haben Permeabilitätsveränderungen an mitochondrialen Membranen gravierende Auswirkungen auf den Energiehaushalt der Zelle (Bonventre, 1997). Auf der anderen Seite ist die Folge eines Integritätsverlustes der Plasmamembran gezwungenermaßen die Zelllyse, die in der massiven Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile und proteolytischer Enzyme resultiert (Bonventre, 1997).

Die Entwicklung von *knock-out* Mäusen und selektiven Inhibitoren für die verschiedenen PLA₂ hat die experimentelle Erforschung dieser Aspekte ermöglicht. Basierend auf einer Vielzahl an Untersuchungen stellte man zusammenfassend fest (Cummings *et al.*, 2000; Chakraborti, 2003), dass die jeweilige regulatorische Einflussnahme von PLA₂ auf schwerwiegende zelluläre Störungen, Membrandestruktionen und den Zelltod sehr streng durch den auslösenden Stimulus, die PLA₂ Gruppe, die Beschaffenheit und Lokalisation der hydrolysierten Membran und den Typ der hydrolysierten Phospholipide determiniert wird.

In cPLA₂ überexprimierenden Zellen konnte beispielsweise die Sensibilisierung für den H₂O₂ stimulierten Zelltod gezeigt werden (Sapirstein *et al.*, 1996). Reaktive Sauerstoffspezies führen zu einer Erhöhung der intrazellulären Ca²⁺-Konzentration und stimulieren so unter anderem die cPLA₂-Bindung an intrazelluläre Membranen.

Interessanterweise demonstrierten Han *et al.* (Han *et al.*, 2003) in murinen Mesangialzellen, dass diese H₂O₂-induzierte, cPLA₂ vermittelte Toxizität stark von einer Regulation der cPLA₂ durch sPLA₂ abhängt. Unabhängig vom Sauerstoffradikal-induzierten Zelltod konnte auch unter Verwendung anderer Modelle, wie zum Beispiel der Oxalat-induzierten Zellschädigung eine entscheidende Rolle der cPLA₂ in stimulusabhängigen toxischen Zellveränderungen und somit der Pathogenese schwerer Erkrankungen demonstriert werden (Sapirstein *et al.*, 1996; Sapirstein und Bonventre, 2000a; Sapirstein und Bonventre, 2000b).

Zellschädigende Wirkungen der sPLA₂ wurden vor allem für die in Schlangen- und Insektengiften vorhandenen Vertreter beschrieben, die zumeist myo-, neuro- oder kardiotoxische Effekte haben. Interessanterweise ist die durch zelluläre sPLA₂ induzierte Zytotoxizität stark vom Typ des Phospholipids abhängig. Phosphatidylethanolamin dient hierbei bevorzugt als Substrat (Vadas, 1997; Cummings *et al.*, 2000). In unstimulierten Zellen befindet es sich an der Innenseite der intakten Plasmamembran. Zytotoxische Stimuli verursachen Veränderungen in der Phospholipidkomposition der Plasmamembran welche wiederum Perturbationen in der Plasmamembranintegrität induzieren. Erst diese machen das Substrat der sPLA₂ für das Enzym zugänglich (Balsinde und Dennis, 1996; Vadas, 1997). Diese Präferenz für die polare Kopfgruppe im Phospholipid lässt darauf schließen, dass nicht unbedingt nur die freigesetzte Fettsäure, wie beispielsweise AA (Pompeia, 2003), sondern auch das entsprechende Lysophospholipid Mediator der Zellschädigung sein kann (Cummings *et al.*, 2000; Chakraborti, 2003).

Im Gegensatz zu diesen Beobachtungen steht die Tatsache, dass bestimmte PLA₂ die Hydrolyse und somit Beseitigung von Membranphospholipiden, die durch freie Radikale beschädigt wurden, bewirken können. Diese PLA₂ wirken demzufolge der Zytotoxizität entgegen (Salgo *et al.*, 1993).

1.5 Zielsetzung der Arbeit

Die durch autonome Parvoviren, wie MVMP, ausgeprägte Onkosuppression wird unter anderem durch die Sensibilität einer Zelle für den virusinduzierten Zelltod beeinflusst. Das genaue Verständnis der Mechanismen, welche der MVMP induzierten Lyse der Wirtszelle zugrunde liegen, ist somit von bedeutender Relevanz. Sowohl metabolische als auch morphologische Veränderungen, die infolge einer MVMP Infektion zu beobachten sind, wurden bisher vor allem auf Funktionen des viralen NS1 Proteins zurückgeführt. Hingegen sind die Mechanismen, welche schließlich zum Verlust der Plasmamembranintegrität und zur Lyse der Zelle führen, unklar und bisher kaum untersucht.

In der Erwägung viraler und zellulärer Faktoren, die für die MVMP induzierte Zelllyse von funktioneller Bedeutung sein könnten, weckten PLA₂ Enzyme aus den folgenden Gründen das Interesse. PLA₂ haben durch ihre hydrolytische Aktivität an Membranphospholipiden zum einen entscheidenden Einfluss auf die Produktion von Lipidmediatoren, andererseits regulieren sie aber auch die Zusammensetzung, Form und Integrität zellulärer Membranen. Sie sind daher auch als Effektoren des lytischen Zelltods beschrieben. Interessanterweise verfügt das Kapsidprotein VP1 der meisten Parvoviren über ein PLA₂ Motiv, dessen katalytische Aktivität für den Eintritt infizierender Viren in den Zellkern von essentieller Bedeutung ist. Somit stellte sich die Frage nach einer möglichen Beteiligung viraler oder zellulärer PLA₂ im Mechanismus der Lyse MVMP infizierter Zellen.

Unter Verwendung rekombinanter MVMP Viren, sollte zunächst analysiert werden, ob die parvovirale PLA₂, neben ihrer Funktion im frühen Stadium der Virusinfektion, möglicherweise auch einen Einfluss auf die später eintretende Zelllyse haben würde. Weiterhin sollte mithilfe spezifischer Inhibitoren auch die Bedeutung der verschiedenen Subtypen zellulärer PLA₂ Enzyme (sPLA₂, cPLA₂, iPLA₂) in der MVMP induzierten Zelllyse erforscht werden. Unterschiedliche biochemische Ansätze sollten anschließend Hinweise auf die mögliche Aktivierung der zellulären Enzyme nach MVMP Infektion liefern. Ferner sollte ein in der NS-Region mutiertes und als hypolytisch beschriebenes MVMP Virus genutzt werden, weitere Erkenntnisse über den Prozess der viralen Regulation zellulärer Effektoren in der Zelllyse zu erhalten.

Die erzielten Ergebnisse sollten nicht nur zur Aufklärung des lytischen Mechanismus von MVMP, sondern darüber hinaus auch zum besseren Verständnis der onkosuppressiven Eigenschaften autonomer Parvoviren beitragen.

2. Materialien und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Zelllinien

A9	murine Bindegewebszelllinie, abstammend von L929 (Tattersall und Bratton, 1983)
293T	humane Nierenzelllinie, SV-40 T-Antigen und Ad5 transformiert (Pear <i>et al.</i> , 1993)

2.1.2 Virusstämme

MVMp	fibrotroper Wildtypstamm des autonomen Parvovirus <i>Minute Virus of Mice</i> , Prototyp (Astell <i>et al.</i> , 1983b)
NS-P4-GFP	MVMp-Rekombinante, 848 bp zu Beginn der VP2 Sequenz in pdBMVp (infektiöser MVMp Klon, siehe 2.1.4.) wurden ersetzt durch 849 bp, die unter Kontrolle eines zusätzlichen P4 Promotors (126 bp) für EGFP (723 bp) kodieren
NS-P4-VP1ntGFP	MVMp-Rekombinante, 848 bp zu Beginn der VP2 Sequenz in pdBMVp (infektiöser MVMp Klon, siehe 2.1.4.) wurden ersetzt durch 1279 bp, die unter Kontrolle eines zusätzlichen P4 Promotors (126 bp) für die MVMp VP1 N-terminale Verlängerung (430 bp) und EGFP (723 bp) kodieren

NS-P4-mVP1ntGFP	MVMp-Rekombinante, 848 bp zu Beginn der VP2 Sequenz in pdBMVp (infektiöser MVMp Klon, 2.1.4.) wurden ersetzt durch 1279 bp, die unter Kontrolle eines zusätzlichen P4 Promotors (126 bp) für die MVMp VP1 N-terminale Verlängerung (430 bp), mit Punktmutation H69G, und EGFP (723 bp) kodieren
MVMp585A/93G	MVMp-Punktmutante, T585A (in NS1) bzw. A93G (in NS2) Punktmutation im Bereich der NS-Proteine, hypotoxisch, (Daeffler <i>et al.</i> , 2003)

2.1.3 Bakterienstämme

<i>E. coli</i> SURE	e14 ⁻ (McrA ⁻), $\Delta(mcrCB-hsdSMR-mrr)$ 171, <i>endA1</i> , <i>supE44</i> , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>rel A1</i> , <i>lac</i> , <i>recB</i> , <i>recJ</i> , <i>sbsC</i> , <i>umuC:Tn5</i> (Kan ^r), <i>uvrC</i> [F ⁻ <i>proAB</i> , <i>laqI</i> ^{qZ} Δ M15, Tn10(Tetr)] ^c (Stratagen, USA)
---------------------	---

2.1.4 Plasmide

pdBMVp Δ 800	(Kestler <i>et al.</i> , 1999)
dBMVpNS-P4-GFP	(J.Nüesch)
pdBMVpNS-P4-VP1ntGFP	(J.Nüesch)
pdBMVpNS-P4-mVP1ntGFP	(J.Nüesch)
pCMVVP	(C.Kornfelder 1997, Diplomarbeit)

2.1.5 DNA-Oligonukleotide

Alle nachfolgend aufgelisteten Oligonukleotide wurden von MWG (Ebersberg) bezogen.

2.1.5.1 Oligonukleotide zur sPLA₂-Subtypisierung

Zielgen	Name	Sequenz 5' → 3'	Produkt- größe
sPLA ₂ -IB	sPLA ₂ -IB-for	ACC CCA GTG GAC GAC TTA GA	197 bp
	sPLA ₂ -IB-rev	TCA CGG TCA CAG TTG CAG AT	
sPLA ₂ -IIA	sPLA ₂ -IIA-for	GGC TGT GTC AGT GCG ATA AA	201 bp
	sPLA ₂ -IIA-rev	TTT ATC ACC GGG AAA CTT GG	
sPLA ₂ -IIC	sPLA ₂ -IIC-for	CCG GGA TCC TAG AAA ACA CA	200 bp
	sPLA ₂ -IIC-rev	TGT CCC GAA CAT CCT CTT TC	
sPLA ₂ -IID	sPLA ₂ -IID-for	GAA CCA CCG GCC TAA TTA CA	200 bp
	sPLA ₂ -IID-rev	GAT GAA GGT AGG CTG GGT CA	
sPLA ₂ -IIE	sPLA ₂ -IIE-for	CCT GCG AGT GTG ACA AGA GA	206 bp
	sPLA ₂ -IIE-rev	ATG AGT CTG CTG GGA GAG GA	
sPLA ₂ -IIF	sPLA ₂ -IIF-for	AAC ACT CCA CTG GAC GGA AG	203 bp
	sPLA ₂ -IIF-rev	GTA GCC CAC AAA GGA CAG GA	
sPLA ₂ -V	sPLA ₂ -V-for	CTC ACA CTG GCT TGG TTC CT	202 bp
	sPLA ₂ -V-rev	CAT AAC AAC GGT CGT GCA TC	
sPLA ₂ -X	sPLA ₂ -X-for	GTG ACG AGG AGC TGG CTT AC	199 bp
	sPLA ₂ -X-rev	CTT GGA CTG CGG TGA CTC TC	
sPLA ₂ -XII-1	sPLA ₂ -XII-1-for	GGG CAG GAA CAG GAC CAG ACC A	179 bp
	sPLA ₂ -XII-1-rev	GGT TTA TAT CCA TAG CGT GGA	
GAPDH	GAPDH-for	ACC ACA GTC CAT GCC ATC AC	452 bp
	GAPDH-rev	TCC ACC ACC CTG TTG CTG TA	
NS/VP	NS/VP-for	ACG CTC ACC ATT CAC GAC ACC GAA A	414 bp/ 511 bp*
	NS/VP-rev	ATC ATA GGC CTC GTC GTG CTC TTT G	

* NS/VP-for startet in der NS1 Sequenz (nt 1997), NS/VP-rev startet in der VP Sequenz (nt 2508). Die Fragmentsequenz beinhaltet ein Intron. Dadurch kann zwischen viraler DNA (mit Intron, *unspliced* 511 nt) und viraler mRNA (ohne Intron, *spliced*, 414 nt) unterschieden werden.

2.1.6 Kulturmedien und Zusätze

2.1.6.1 Zellkulturmedien und Zusätze

MEM (<i>Minimum Essential Medium Eagle</i>)	Sigma
MEM 2x (<i>Minimum Essential Medium Eagle 2x</i>)	Gibco BRL, Invitrogen
DMEM (<i>Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium</i>)	Sigma
FCS	BIOCHROM
Gentamycin (10 mg / ml)	Gibco BRL, Invitrogen
Penicillin-Streptomycin (10 000 U / ml)	Gibco BRL, Invitrogen
L-Glutamin (200 mM)	Gibco BRL, Invitrogen
Trypsin-EDTA	Gibco BRL, Invitrogen

2.1.6.2 *E. coli*-Medien und Zusätze

Bacto-Agar	Difco, USA
Bacto-Hefeextrakt	Difco, USA
Bacto-Trypton	Difco, USA
Ampicillin	Sigma
Tetracyclin	Sigma

2.1.7 Enzyme

RNase	Sigma
DNase	Gibco BRL, Invitrogen
Proteinase K	Böhringer Mannheim
T4 DNA Ligase	New England Biolabs
Reverse Transkriptase	Promega
Restriktionsenzyme	Böhringer Mannheim, New England Biolabs, Gibco BRL
Heparinase	Sigma

2.1.8 Antikörper

2.1.8.1 Primärantikörper

Antikörper	Spezies	Referenz/ Firma	Verdünnung in	
			Western Blot	Immun- fluoreszenz
α -NS1 SP8	Kaninchen	(Brockhaus <i>et al.</i> , 1996)	1:2000	1:100
α -NS1 3D9	Maus	(Cziepluch <i>et al.</i> , 2000)	1:100	
α -NS2 SP6	Kaninchen	(Brockhaus <i>et al.</i> , 1996)	1:2000	
α -VP-TATT3	Kaninchen	(Cotmore <i>et al.</i> , 1997)	1:2000	
α -VP1nt	Kaninchen	L. Daeffler	1:1500	
α - β -tubulin	Maus	Sigma	1:1000	
α -cPLA ₂	Maus	Cell Signalling, USA	1:500	1:50
α -cPLA ₂	Ziege	Santa Cruz, USA	1:50	
α -cPLA ₂	Kaninchen	Cell Signalling, USA	1:1000	1:50
α -phospho-cPLA ₂ (Ser505)	Kaninchen	Cell Signalling, USA	1:1000	
α -p38 MAPK	Kaninchen	Cell Signalling, USA	1:1000	
α -p44/42 MAPK	Kaninchen	Cell Signalling, USA	1:1000	
α -phospho-p44/42 MAPK (Thr202/Tyr204)	Kaninchen	Cell Signalling, USA	1:1000	
α -phospho-p38 MAPK (Thr180/Tyr182)	Kaninchen	Cell Signalling, USA	1:1000	
α -low mw PLA ₂	Kaninchen	Upstate Biotech., USA	1:500	
α -sPLA ₂	Ziege	Santa Cruz, USA	1:200	
α -sPLA ₂ -IB	Kaninchen	G.Lambeau, Frankreich	1:500	
α -sPLA ₂ -IIA	Kaninchen	G.Lambeau, Frankreich	1:500	
α -sPLA ₂ -IIE	Kaninchen	G.Lambeau, Frankreich	1:500	
α -sPLA ₂ -V	Kaninchen	G.Lambeau, Frankreich	1:500	

2.1.8.2 Sekundärantikörper

2.1.8.2.1 Sekundärantikörper für Western Blot

Sämtliche Antikörper für die Verwendung im Western Blot sind HRP (*horseradish peroxidase*)-konjugiert.

Antikörper	Spezies	Referenz/ Firma	Verdünnung
α -Maus	Ziege	Promega	1 : 5000
α -Kaninchen	Ziege	Promega	1 : 10 000
α -Ziege	Esel	Promega	1 : 2000

2.1.8.2.2 Sekundärantikörper für Immunfluoreszenzfärbung

Antikörper	Spezies	Referenz/ Firma	Verdünnung
α -Maus AlexaFluor [®] 488	Esel	Molecular Probes	1 : 700
α -Kaninchen AlexaFluor [®] 594	Esel	Molecular Probes	1 : 700
α -Ziege AlexaFluor [®] 488	Esel	Molecular Probes	1 : 700

2.1.9 Radioaktives Material

[α -³²P]-dCTP

Amersham

[³H(N)]-Arachidonsäure

Perkin Elmer Life Sciences

2.1.10 Rekombinante Proteine

Rekombinante sPLA₂ Proteine der Subtypen -IB, -IIA, -IIE und -V aus der Maus wurden durch G. Lambeau (Universität Valbonne, Frankreich) zur Verfügung gestellt.

2.1.11 Größenstandards

2.1.11.1 DNA-Längenstandards

λ DNA <i>Eco</i> RI + <i>Hind</i> III	Fragmente in nt: 564, 831, 947, 1375, 1584, 1904, 2027, 3530, 4268, 4973, 5148, 21226	Fermentas
GeneRuler™ (1 kb DNA ladder)	Fragmente in nt: 80, 100, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1031	Fermentas

2.1.11.2 Protein-Molekulargewichtstandards

Rainbow™	Größen in kDa: 14.3, 20.1, 30, 45, 66, 97, 220	Amersham
Kaleidoscope Polypeptide Standards (low range)	Größen in kDa: 3.5, 6.8, 13.7, 22.3, 30.2	BioRad

2.1.12 Reagenziensätze (Kits)

Megaprime DNA Labelling System	BioRad
Qiagen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Qiagen Plasmid Mini Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
TA cloning Kit 2.1	Invitrogen
Advantage®–HF PCR Kit	Clontech
ECL™ Western Blotting Detection Reagents	Amersham
CytoTox96®	Promega
Prostaglandin E ₂ EIA Kit	Cayman Chemicals

2.1.13 Chemikalien

Standardchemikalien wie Salze, Säuren, Basen, anorganische und organische Lösungen wurden in der jeweils höchsten Reinheit durch die Firmen Amersham, Böhlinger Mannheim, Merck, Roth, Serva oder Sigma bezogen.

2.1.13.1 Spezielle Chemikalien

12- <i>epi</i> -Scalaradial	Alexis Biochem.
Bromoenollacton (BEL)	Alexis Biochem.
Methylarachidonylfluorophosphonat (MAFP)	Alexis Biochem.
Arachidonyltrifluoromethylketon (AACOCF ₃)	Calbiochem
LY-311727	M. Kaszkin (Universität Frankfurt/M.)
Pyrrolidine-I	G. Lambeau (Universität Valbonne, Frankreich)
	M. Gelb (Universität of Washington, USA)
Me-Indoxam	G. Lambeau (Universität Valbonne, Frankreich)
	M. Gelb (Universität of Washington, USA)
Arachidonsäure	Sigma
4-Bromo-Ca ²⁺ Ionophore (A23187)	Sigma
Heparin	Sigma

2.1.13.2 Sonstige Chemikalien und Materialien

Acrylamid / Bisacrylamid 29:1	Appligene
Agarose	Gibco BRL, Invitrogen
Ammoniumpersulfat (APS)	BioRad
β-Mercaptoethanol	Roth
Bromphenolblau	Serva
Deckgläschen	Langenbrinck
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma

Einwegpipetten (Costar STRIPETTE®)	Corning
Elektroporationsküvetten	EUROGENTEC
Heringssperma-DNA	Roche
Iodixanol	Sigma
1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl- formazan (MTT)	Sigma
Neubauerzählkammer	Neubauer
Nitrozellulose (Protran BA85)	Schleicher & Schüll
Nitrozellulosefilter (NC45, Cellulosenitrat)	Schleicher & Schüll
Nylonmembran (Hybond™-N)	Amersham
Norleucin	Sigma
Objektträger, Teflon beschichtet (<i>Spot slides</i>)	Roth
Protease Inhibitor Cocktail	Roche
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Serva
Protein A, G Sepharose	Pharmacia
Polaroidfilm 667	Polaroid
Röntgenfilm X-OMAT AR	Kodak
Sephadex G-50	Pharmacia
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Sigma
Tween 20	Sigma
Triton X-100	Serva
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Sigma
Whatman-Papier 3MM®	Schleicher & Schüll
Zellkulturschalen	Greiner / Nunc
Zellhomogenisator (Douncer)	B. Braun
Zellschaber Costar®	Corning

2.1.14 Spezielle Geräte

Agarosegelelektrophoresekammern Easy Cast™ B1A	Owl Scientific Incorp.
<i>Cerenkov Counter</i> Quick Count™	Bioscan
Durchlichtmikroskop	<i>hund</i>
Durchflusszytometer FACScan®	Beckton Dickinson
1D Elektrophoresekammern PROTEAN® II xi Cell	BioRad
Elisa Reader	Labsystems Multiskan MS
Elektroporationsgerät <i>Gene Pulser</i> ®	BioRad
Fluoreszenzmikroskop Leitz DRMD	Leica
Heizblock <i>Thermomixer Comfort</i> ®	Eppendorf
<i>GeneAmp</i> PCR System 9700	Applied Biosystems
Spektrophotometer <i>Ultraspec 3100 pro</i>	Amersham
Stratalinker® UV Crosslinker	Stratagen
Schüttelwasserbad SW-20C	Julabo
Liquid Scintillation Analyzer 1600CA TRI-CAB®	PACKARD
<i>Trans-Blot</i> ® Apparatur	BioRad
UV-Fotoapparatur ImageMaster® VDS	Pharmacia
Zentrifugen: Sorvall RC5B und RC5C	Du Pont
Tischzentrifuge 5415C	Eppendorf
Ultrazentrifuge Optima™ LE-80K	Beckman
Mini-Ultrazentrifuge TL-100	Beckman
Laborzentrifuge 2K15	Sigma
Zellkulturzentrifuge ZK380	Hermle

2.2 Methoden

2.2.1 Zellbiologische Methoden

2.2.1.1 Kultivierung von Säugerzellen

Wenn nicht anders vermerkt, wurden etablierte Säugetierzelllinien als *Monolayer*-Kulturen in Zellkulturschalen bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert. Dabei diente MEM pH 7.2 versetzt mit 5 % FCS (inaktiviert durch Inkubation bei 50 °C für 30 min), 2 mM L-Glutamin und 100 µg / ml Penicillin / Streptomycin als Medium für A9 Zellen. Als Medium für 293T Zellen wurde DMEM pH 7.2 versetzt mit 10 % fetalem Kälberserum (FCS, inaktiviert durch Inkubation bei 50 °C für 30 min), 2 mM L-Glutamin und 100 µg / ml Gentamycin verwendet. Bei Konfluenz und zur Vermehrung wurden alle Zelllinien ungefähr zweimal pro Woche mit einer Trypsinlösung (0.25 % Trypsin, 1 mM EDTA) von der Kulturschale abgelöst und in gewünschter Verdünnung in frischem Medium neu ausgesät.

2.2.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die langfristige Aufbewahrung von Zellen wurden diese in einer Dichte von 2.5×10^6 / ml eingefroren. Hierzu wurden trypsinisierte Zellen pelletiert (5 min bei 250 x g), in 1 ml Einfriermedium (20 % FCS, 10 % DMSO in MEM) aufgenommen und in Kryoröhrchen überführt. Die Kryoröhrchen wurden in einem mit Isopropanol isolierten Behälter innerhalb von 24 h auf -80 °C abgekühlt und schließlich bei -80 °C gelagert.

Zur Aussaat eingefrorener Zellen wurden diese im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut, in 10 ml Kulturmedium aufgenommen und durch Zentrifugation (5 min bei 250 x g) pelletiert. Nach Resuspension in frischem Medium wurden die Zellen in Kulturschalen ausgesät.

2.2.1.3 Bestimmung der Zellzahl

Zur Bestimmung der Anzahl von Zellen in einer Suspension wurde ein Aliquot mit Hilfe einer Pasteurpipette in eine *Neubauer*-Zählkammer überführt und die Zellen anhand der markierten Quadrate auf dem Objektträger unter dem Mikroskop ausgezählt. Die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension berechnete sich wie folgt:

$\text{Zellzahl / ml} = \text{durchschnittliche Zellzahl pro Großquadrat} \times 10^4 \times \text{Verdünnungsfaktor}$

2.2.1.4 Synchronisation von Säugetierzellen durch Serumentzug

Adhärente, asynchron kultivierte Zellen wurden trypsinisiert, abzentrifugiert (5 min bei 250 x g), drei mal mit MEM Medium (ohne Zusätze) gewaschen und anschließend für 3 h bei 37 °C unter kontinuierlicher Bewegung in einem Rollkarussell inkubiert. Danach wurden die Zellen erneut zentrifugiert, in MEM Medium pH 7.2, versetzt mit 0.5 % FCS (inaktiviert durch Inkubation bei 50 °C für 30 min), 2 mM L-Glutamin und 100 µg / ml Penicillin / Streptomycin, aufgenommen, in gewünschter Dichte ausgesät und bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit für drei Tage inkubiert, um sie in der G0 / G1-Phase zu arretieren. Der Synchronisationsgrad wurde mittels FACS-Analyse überprüft. Zur synchronen Induktion des Zellzyklus wurden die in G0 / G1 arretierten Zellen für 12 h mit 20 % FCS versetzt und somit die S-Phase stimuliert.

2.2.1.5 Transfektion von Plasmid DNA in Säugetierzellen nach der CaPO₄-Methode

Am Vortag der Transfektion wurden 4×10^6 Zellen pro 14 cm Kulturschale in 20 ml Medium ausgesät. Pro Kulturschale wurde die zu transfizierende DNA in einem Endvolumen von 405 µl sterilem H₂O gelöst und mit 45 µl 2.5 M CaCl₂ gemischt. Anschließend wurde der Ansatz unter kontinuierlichem Mischen mit 450 µl 2 x HBSS, pH 7.5 (280 mM NaCl, 50 mM Hepes, 12 mM Glucose, 10 mM KCl, 1,5 mM Na₂HPO₄) versetzt. Nach einer Inkubation von 15 min bei RT wurde das DNA-Präzipitat tropfenweise über die Zellen pipettiert und durch leichtes Schwenken gleichmäßig im Medium verteilt. Ohne Mediumwechsel wurden die Zellen 2 bis 3 Tage bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit kultiviert.

2.2.1.6 Kultivierung von Säugetierzellen auf Objektträgern

Zum Nachweis von viralen und zellulären Proteinen durch spezifische Antikörper in der Immunfluoreszenz, wurden die Zellen auf Objektträgern (Spot slides) in einer Dichte von 2 000 Zellen pro Spot in 50 µl Kulturmedium ausgesät. Zur Kultivierung der ausgesäten Zellen wurden die Objektträger in Petrischalen, in welche leicht angefeuchtete Watte an den Rand gelegt wurde, bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert.

2.2.1.7 Methoden zur Bestimmung zytopathischer Effekte

Zur Bestimmung zytopathischer Effekte nach Infektion wurden die Zellen subkonfluent in 96 well Schalen in einem Volumen von 100 µl Medium pro well einen Tag vor Infektion ausgesät und nach der Infektion (2.2.2.3) für den gewünschten Zeitraum bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit inkubiert. Unmittelbar vor dem zu verwendenden Test, wurden einige wells als Positiv-Kontrolle mit 10 µl eines 10 x Lysepuffer (10 % Triton X-100) versetzt. MTT- und LDH-Test wurden stets parallel auf die selben Zellkulturen angewandt.

2.2.1.7.1 LDH-Test

LDH (Lactat-Dehydrogenase) ist ein zelluläres zytoplasmatisches Enzym, welches bei Verlust der Plasmamembranintegrität ins Kulturmedium freigesetzt wird. Hierin kann es mittels einer kolorimetrischen Methode nachgewiesen werden. Für diesen Test wurde das CytoTox96[®] Kit (Promega, Mannheim) nach Angabe des Herstellers verwendet. Der LDH-Test wurde gewöhnlich mit 50 µl Überstand aus 100 µl Gesamtmedium pro well durchgeführt.

2.2.1.7.2 MTT-Test

Zur Feststellung der Lebensfähigkeit von Zellen, wurden diese daraufhin untersucht, ob sie die metabolische Fähigkeit besitzen durch mitochondriale Dehydrogenasen aus MTT 1-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-3,5-diphenyl-formazan ein unlösliches, violett gefärbtes Formazanpräzipitat zu bilden. Nach der Entnahme von 50 µl Kulturmedium

für den LDH-Test (2.2.1.7.1), wurden 10 µl einer 5 mg / ml MTT-Lösung zu den Zellen gegeben und für 4 h bei 37 °C weiter inkubiert. Anschließend wurde die Schale zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach 30 min Trocknen bei 37 °C wurde das Präzipitat in 100 µl Isopropanol pro *well* durch Schütteln gelöst. Die Absorption der Formazan-Färbung, welche direkt proportional zur Anzahl vitaler Zellen ist, wurde in einem ELISA-Reader bei einer Wellenlänge von 595 nm gemessen.

2.2.1.8 Bestimmung von sPLA₂ Aktivität in Zellkulturüberständen

Zum Nachweis der Sekretion von enzymtisch aktiver sPLA₂ im Zellkulturüberstand wurden in einem Reaktionsansatz (Märki und Franson, 1986; Beck *et al.*, 2003b) 5 µl Kulturüberstand mit 100 mM Tris-HCl pH7.0, 10 mM CaCl₂, 0.1 % fettsäurefreiem FCS und ca. 10 000 cpm [1-¹⁴C] Ölsäure-markierten E. coli Membranen gemischt und bei 37 °C 30 min inkubiert. Nach einer kurzen Zentrifugation bei 12 000 x g für 3 min wurde hydrolysierte [1-¹⁴C] Ölsäure im Überstand mit einem *Liquid Scintillation Analyzer* gemessen.

2.2.1.9 *In vivo* [³H]-AA Markierung von Zellmembranen

Zur Untersuchung der Aktivität von Phospholipase A₂ Enzymen wurden Zellen *in vivo* mit [³H]-konjugierter Arachidonsäure ([³H]-AA) markiert, da diese während physiologischer Membranumordnungen in die zellulären Membranphospholipide eingebaut wird. Hierzu wurden A9 Zellen trypsiniert, in Kulturmedium MEM pH 7.2, versetzt mit 5 % FCS (inaktiviert durch Inkubation bei 50 °C für 30 min), 2 mM L-Glutamin, 100 µg / ml Penicillin / Streptomycin und 05 µCi / ml [³H]-AA aufgenommen und in einer Dichte von 4 x 10⁶ / 500 µl in 24 well Kulturschalen ausgesät. Die [³H]-AA Markierung bei 37 °C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit erfolgte für mindestens 24 h. Um die markierten Zellen zur Infektion zu verwenden, wurden sie im Voraus zweimal mit je 500 µl serumfreiem Medium gewaschen, um überschüssige [³H]-AA zu entfernen.

2.2.1.10 Bestimmung von [³H]-AA-Freisetzung

A9 Zellen wurden wie in 2.2.1.9 mit [³H]-AA markiert. Zur Bestimmung der aus infizierten Zellen in das Kulturmedium freigesetzten [³H]-AA Menge wurden jeweils 600 µl Kulturüberstand in ein Eppendorfröhrchen überführt und zunächst für 3 min bei 1200 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert, um eventuell im Medium befindliche Zellmembrantrümmer zu entfernen. 500 µl des Überstandes wurden anschließend mit 4 ml Scintillationslösung sorgfältig gemischt und anschließend im Liquid Scintillation Analyzer unter Verwendung des Cerenkov Programms gemessen. Die Gesamtmenge inkorporierter und somit maximal freisetzbarer [³H]-AA wurde durch die Messung einer Probe bestimmt, die sich aus der Gesamtzellzahl eines wells inklusive des dazugehörigen Kulturüberstandes zusammensetzte.

2.2.1.11 Bestimmung von PGE₂-Freisetzung

Zur Bestimmung von PGE₂ wurden jeweils 100 µl Kulturüberstand / *well* einer 24 *well* Kulturschale zunächst für 3 min bei 1200 rpm in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. 50 µl des Überstandes wurden entweder vorerst bei -80 °C gelagert oder seriell verdünnt, direkt mit dem PGE₂ EIA Kit (Cayman Chemicals) nach Angaben des Herstellers getestet.

2.2.2 Virologische Methoden

2.2.2.1 Produktion rekombinanter Viren durch Kotransfektion in 293T Zellen

Rekombinante MVMP Viren wurden durch Kotransfektion der rekombinanten Plasmid- und der sogenannten Helferplasmid-DNA nach der CaPO₄⁻-Methode hergestellt. Der Produktionsablauf ist schematisch in Abb. 2-1 verdeutlicht. Hierzu wurden, wie in 2.2.1.5 beschrieben, rekombinante Plasmid-DNA und Helferplasmid-DNA immer im Verhältnis 1 : 2 (12 : 24 µg für 4 x 10⁶ Zellen pro 15 cm Schale) unter Zugabe von 2.5 M CaCl₂ präzipitiert und gleichmäßig über die Zellen verteilt. Drei Tage nach Transfektion wurden die Zellen durch Abschaben geerntet, durch Zentrifugation bei 250 x g für 5 min pelletiert und in vTE-Puffer (50 mM Tris / HCl, pH8.7, 0.5 mM EDTA) aufgenommen. Hierbei wird das vierfache Volumen des

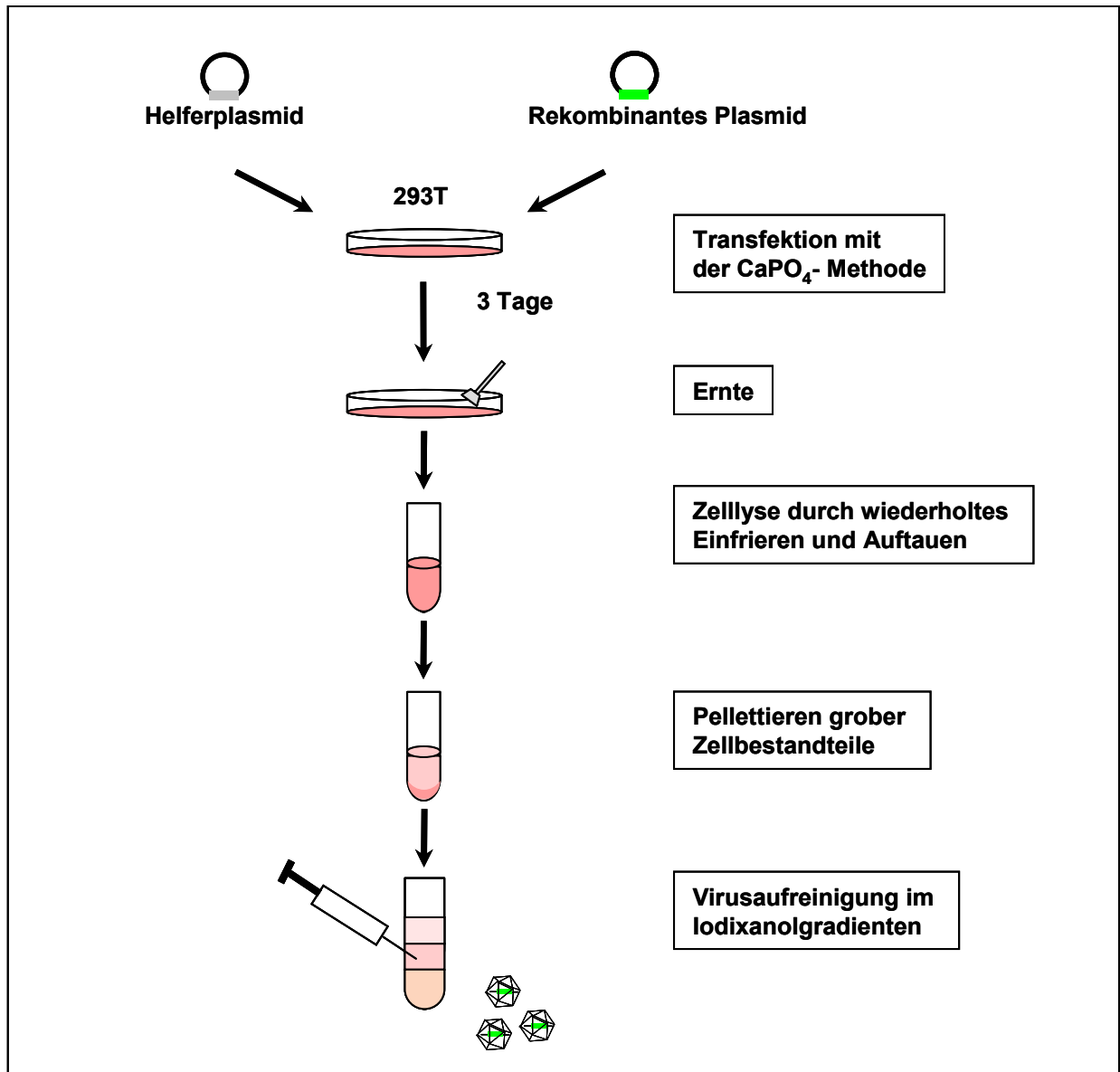


Abb. 2-1.: Produktion rekombinanter MVMP Viren und Aufreinigung.

Pellets an VTE-Puffer eingesetzt. Durch fünffaches Einfrieren (auf Trockeneis) und Auftauen (bei 37 °C im Wasserbad) wurden die Zellen aufgeschlossen und das Virus freigesetzt. Durch Zentrifugation bei 250 x g wurden Zelltrümmer konzentriert und entfernt. Der virushaltige Überstand wurde bei 4 °C gelagert.

2.2.2.2 Aufreinigung und Konzentration von Viren im Iodixanolgradienten

Zur Aufreinigung und Konzentration von vTE-Virusextrakten sowie zur Isolation leerer Kapside aus der Präparation wurde ein diskontinuierlicher Gradient aus unterschiedlich konzentrierten Iodixanollösungen verwendet. Hierzu wurde Iodixanol

(Sigma) zunächst mit PBS-MK (PBS [137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 8.1mM Na₂HPO₄, 1.15 mM KH₂PO₄ pH 7.3] versetzt mit 1 mM MgCl₂ und 2.5 mM KCl) auf 15, 25, 40 und 60 % verdünnt. Um die Phasen optisch einfacher unterscheiden zu können, wurden die 25%ige und die 60 % ige Iodixanollösung mit 0.01 µg / ml Phenol-Rot versetzt. Außerdem enthielt die 15 % ige Phase 1 M NaCl, um eine Aggregation von Viruspartikeln zu verhindern. Der Gradient wurde in Quick-Seal tubes (Beckman) von unten nach oben in der Reihenfolge 60, 40, 25 und 15 % iges Iodixaol pipettiert und mit der aufzureinigenden virushaltigen Suspension überschichtet. Pro 20 ml aufzureinigender Lösung wurden 4 ml 60, 4 ml 40, 4 ml 25 und 7 ml 15 %ige Iodixanollösung verwendet . Durch eine Zentrifugation bei 4 °C und 50 000 rpm für 2.5 h in einer Ultrazentrifuge (50.2Ti-Rotor, Beckmann) sammeln sich aufgrund ihrer Dichte, DNA-haltige Viruskapside in der 40 % igen Phase, Zellüberreste und leere Viruskapside in der 25 % igen Phase. Die 40 % ige Phase wurde mit Hilfe einer Spritze entnommen und bei 4 °C gelagert.

2.2.2.3 Virusinfektion von Säugerzellen

Die zu infizierenden Zellen wurden einen Tag vor der Infektion subkonfluent ausgesät. Zur Infektion wurden die Kulturen mit einem definierten Verhältnis von Virusanzahl zu Zelle (MOI, multiplicity of infection), verdünnt in serumfreiem Medium, inokuliert. Das benötigte Volumen einer Virusstammlösung richtete sich nach der gewünschten MOI, dem erforderlichen Volumen des Inokulums und der zu infizierenden Anzahl Zellen. Das Volumen des Inokulums betrug je nach Größe der verwendeten Kulturschale: 400 µl pro 6 cm, 1 ml pro 10 cm bzw. 3 ml pro 14 cm. Für die Infektion wurde das Medium abgenommen und das Inokulum aufpipettiert. Durch gelegentliches Schwenken für 1 h wurde eine gleichmäßige Verteilung der infektiösen Suspension garantiert. Die Suspension wurde anschließend entfernt und zur weiteren Kultivierung durch komplettes Medium ersetzt.

2.2.2.4 Quantifizierung von Virusstocks

2.2.2.4.1 Plaque-Assay

Das Prinzip des Plaque-Assays beruht auf der plaqueförmigen Ausbreitung zytopathischer Effekte durch die Infektion von Nachbarzellen durch Nachkommenviren als Folge einer erfolgreichen ersten Infektionsrunde. Die Verteilung von Nachkommenviren in der gesamten Zellkulturschale wird durch Überschichtung der Zellen mit halbfestem Nährmedium verhindert. Nach mehreren viralen Replikationszyklen können die Plaques durch eine Färbung mit Vitalfarbstoff sichtbar gemacht werden.

Einen Tag vor der Infektion von Indikatorzellen mit seriellen Verdünnungen der zu titrierenden Virussuspension wurden A9 Zellen in einer Dichte von 2.5×10^5 Zellen / 6 cm Kulturschale ausgesät. Die Zellen wurden mit 400 µl der jeweiligen Virusverdünnungen (in serumfreiem Medium) für 2 h inkubiert und im Anschluss mit 7 ml halbfestem Nährmedium (80 % MEM 2 x, 10 % FCS, 2 % L-Glutamin, 2 % Gentamicin und 2 % Bacto-Agar) im Verhältnis 4 : 3 überschichtet. Nach Erstarren bei Raumtemperatur wurden die Zellen für weitere 5 Tage kultiviert. Am fünften Tag wurden die Kulturschalen mit je 3 ml Neutralrot-Färbemedium (PBS 2 x, 0.3 % Neutralrot-Lösung und 2 % Bacto-Agar im Verhältnis 15 : 2 : 15) überschichtet und für einen weiteren Tag inkubiert. Anschließend wurde die Zahl der sichtbaren Plaques pro Kulturschale gezählt und daraus der jeweilige Virustiter pro Milliliter in sogenannten plaque forming units (PFU) wie folgt berechnet:

$$\text{PFU / ml} = \text{Anzahl der Plaques einer bestimmten Verdünnungsstufe} \times \text{Verdünnung} \times 1\,000 / \text{Inokulationsvolumen}$$

Rekombinante Viren replizieren nach Infektion ihr Genom, bilden allerdings keine infektiösen Nachkommen, da ihnen hierfür die Kapsidprotein-kodierenden Sequenzen fehlen. Rekombinante Viren können somit nicht mit Hilfe des Plaque-Assays titriert werden.

2.2.2.4.2 Filterhybridisierungs-Assay

Mithilfe des Hybridisierungs-Assays können auch Virustiter rekombinanter replizierender Viren bestimmt werden. Auch bei diesem Verfahren werden Zellen zunächst mit seriellen Verdünnungen der zu titrierenden Viruslösung infiziert. Nach 2 Tagen werden die Zellen auf Nitrozellulosefilter übertragen, die DNA wird fixiert, denaturiert und mit einer für die Virus-DNA spezifischen, radioaktiv markierten DNA-Sonde hybridisiert. Zur Hybridisierung von wildtyp MVMp DNA wurde eine MVMp Sequenz aus dem für die Nichtstrukturproteine kodierenden Bereich von 1638 nt verwendet. Die Hybridisierung von DNA rekombinanter MVMp Viren erfolgte mit einer GFP-spezifischen Sonde von 731 nt.

Zu diesem Zweck wurden einen Tag vor Infektion 2.5×10^5 Zellen pro 6 cm Kulturschale ausgesät. Die gewünschten seriellen Virusverdünnungen, in serumfreiem Medium, wurden auf die Zellen pipettiert und für 2 h inkubiert. Nach 2 h Inokulation wurde supplementiertes Kulturmedium zugegeben und die Zellen für zwei weitere Tage kultiviert. Am zweiten Tag wurde das Medium vollständig abgesaugt und die Zellen mit 2 ml PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Auflegen eines Nitrozellulosefilters (Durchmesser 50 mm) auf diesen transferiert. Die folgenden Behandlungsschritte der Filter wurden stets mit der Zell-gebundenen Seite nach oben vollzogen. Die Filter wurden zunächst getrocknet, dann für 12 min auf ein in Denaturierungspuffer (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH) getränktes Whatman-Papier gelegt. Nach einer weiteren Trocknungsphase wurden sie für 12 min auf ein in Neutralisierungspuffer (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 7.2) getränktes Whatman-Papier gelegt. Nach 15 min trocknen bei Raumtemperatur wurde durch Backen für 2 h bei 80 °C die freigesetzte DNA an die Filter gebunden. Zur Hybridisierung der viralen DNA mit einer sequenzspezifischen DNA-Sonde wurden die Filter zunächst 2 h in Hybridisierungspuffer (3 x SSC, 1 % SDS, 10 x Denhardts Lösung [50 x Denhardts Lösung: 5 % BSA, 5 % Ficoll, 5 % Polyvinylpyrrolidon ad 500 ml H₂O], 5 mM EDTA, 100 ng / ml Heringssperma-DNA) unter Schwenken bei 65°C prähybridisiert. Nach Zugabe der radioaktiv markierten und denaturierten DNA-Sonde (Herstellung siehe 2.2.4.9) wurde die Hybridisierung über Nacht fortgesetzt. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung entfernt, die Filter wurden zweimal für 30 min in Waschlösung I (3 x SSC, 1 % SDS) und anschließend für 30 min in Waschlösung II (0.3 % SSC, 1 % SDS) bei 65 °C gewaschen. Die Filter wurden bei

Raumtemperatur getrocknet, auf Whatman-Papier fixiert, in Folie eingeschlagen und auf einen Röntgenfilm gelegt. Nach Entwicklung des Films sind infizierte Zellen durch Signale viraler DNA als schwarze Punkte erkennbar.

Aus der Anzahl der Signale, wird der Titer als RU (Replication unit) / ml berechnet. Der Korrekturfaktor von 7.5 berücksichtigt dabei die Filtergröße im Verhältnis zur Kulturschale (1 / 3) sowie das Volumen des Inokulums (400 µl):

$$\text{RU / ml} = \text{Mittelwert aus Anzahl der Signale} \times 7.5 \times \text{Verdünnung}$$

2.2.3 Mikrobiologische Methoden

2.2.3.1 Kultivierung und Konservierung von Bakterienstämmen

E. coli Bakterien wurden in Lurea Broth (LB)-Medium (5 g NaCl, 5 g Hefeextrakt, 5 g Bacto-Trypton ad 1 000 ml H₂O, autoklavieren, pH 7.0) oder auf Agarplatten (LB-Medium mit 1,7 % Bacto-Agar) über Nacht bei 37 °C kultiviert. Die in Reagenzgläsern angesetzten Suspensionskulturen wurden hierbei permanent bei 200 rpm geschüttelt. Als Selektionszusätze wurden Ampicillin (100 µg / ml) oder Tetracyclin (50 µg / ml) verwendet. Zur Kryokonservierung wurde 1 ml der Bakterienkultur bei 3 000 rpm für 2 min abzentrifugiert, mit sterilem Glycerol (10 %) versetzt, schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

2.2.3.2 Herstellung elektrokompetenter Bakterien

Eine frische *E. coli* SURE Übernacht-Kultur wurde 1 : 10 in 250 ml LB-Medium verdünnt, bis zu einer OD₅₉₅ von 0.6 – 0.8 bei 37 °C geschüttelt und anschließend für 20 min auf Eis abgekühlt. Die Bakterien wurden 15 min bei 2 °C und 4 000 x g abzentrifugiert, zunächst in 1 Liter 4°C kaltem H₂O, dann in 500 ml 2 °C kaltem H₂O und schließlich in 10 ml 2 °C kaltem 10 % igem Glycerol gewaschen und erneut abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wurde in 1-2 ml 2 °C kaltem 10 % igem Glycerol aufgenommen, aliquotiert und schockgefroren. Die elektrokompetenten Bakterien wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.3.3 Transformation von *E. coli* Bakterien mit Plasmid-DNA durch Elektroporation

Elektrokompetente Bakterien (Herstellung siehe 2.2.3.2) wurden auf Eis aufgetaut. 50 µl der Bakteriensuspension wurden mit 1-2 µl DNA-Lösung (10-100 µg) gemischt und in eine auf Eis abgekühlte Elektroporationsküvette (0.2 cm Elektrodenabstand, EUROGENTEC) überführt. Anschließend wurden die Bakterien bei 200 Ω, 1.8 V und 25 µF in einem E. coli-Gene Pulser (BioRad) elektroporiert. Nach Zugabe von 150 µl reinem LB-Medium wurden die Bakterien auf LB-Agar Selektionsplatten (mit Antibiotikum) ausplattiert und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

2.2.3.4 Selektion bakterieller Kolonien durch α-Komplementation (Blau-weiß Selektion)

Die blau-weiß Selektion dient der vereinfachten Identifikation von Bakterienkolonien mit rekombinantem Plasmid. Viele Vektoren, so auch das in dieser Arbeit verwendete pCR3.1 Plasmid (Invitrogen), codieren für den N-terminalen Teil des β-Galactosidasegens (*lacZα*). Innerhalb dieser Region befindet sich die *multiple cloning site* (MCS). Kommt es zur Expression des *lacZα* Gens in Wirtszellen, welche für den C-terminalen Teil des β-Galactosidasegens kodieren, können die zwei Fragmente zur enzymatisch aktiven β-Galactosidase assoziieren. Dieser Vorgang wird α-Komplementation genannt. X-Gal, ein chromogenes Substrat, welches vor Ausstreichen der Bakterien auf die Platten gegeben wird, kann in diesem Fall durch das Enzym verwertet werden und führt zu einer Blaufärbung der Bakterienkolonie. Wenn aber ein DNA-Fragment erfolgreich in die MCS kloniert wurde, kann der N-terminale Teil des Enzyms folglich nicht exprimiert werden, die α-Komplementation bleibt aus und die Bakterienkolonie bleibt ungefärbt.

Für die blau-weiß Selektion von klonierten rekombinanten Plasmiden, wurden Agar-Platten (siehe 2.2.3.1) zunächst mit 40 µl einer 2 % igen X-Gal Lösung bestrichen und bei Raumtemperatur 30 min getrocknet. Im Anschluss an die Transformation von *E. coli* SURE Zellen mit rekombinanter Plasmid-DNA durch Elektroporation (2.2.3.3) wurden diese auf die X-Gal vorbehandelten Platten ausgestrichen. Nach 12-16 h Inkubation bei 37 °C, konnten positive, das rekombinante Plasmid enthaltende, ungefärbte Klone von den negativen, blau gefärbten Klonen leicht unterschieden und

selektiert werden. Die Kultivierung dieser Klone erfolgte in 4 ml LB-Übernachtskulturen (2.2.3.1).

2.2.4 Molekularbiologische Methoden

2.2.4.1 Präparation von Plasmid-DNA aus *E. coli*

Je nach benötigter Menge an Plasmid-DNA, wurde diese aus einer 4 ml oder einer 250 ml *E. coli* Übernachtskultur aufgereinigt. Hierzu wurde nach Angaben des Herstellers entweder der Qiagen Mini- oder Maxipräparationskit verwendet. Im Anschluss an eine Maxi-Präparation wurde das luftgetrocknete DNA-Pellet in TE-Puffer (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA, pH 8.0) aufgenommen. Die Konzentration der DNA wurde durch Messung verschiedener Verdünnungen photometrisch bestimmt.

2.2.4.2 Photometrische Bestimmung der DNA Konzentration

Nukleinsäuren zeigen ein Absorptionsmaximum bei einer Wellenlänge von 260 nm. Aus der spektrophotometrisch gemessenen Extinktion einer verdünnten Nukleinsäurelösung bei 260 nm lässt sich somit proportional deren Konzentration herleiten. Hierbei gilt, dass eine Extinktion von 1 jeweils einer Konzentration von 50 µg / ml dsDNA, 40 µg / ml RNA bzw. 33 µg / ml ssDNA entspricht. Proteine weisen ein Absorptionsmaximum bei 280 nm auf. Die Reinheit einer DNA Präparation lässt sich demnach aus dem Verhältnis der Absorption einer Probe bei 260 und 280 nm berechnen. Dieses sollte zwischen 1.8 und 2.0 liegen.

2.2.4.3 DNA-Restriktionsverdau

Zur Spaltung von Plasmid-DNA wurden Restriktionsendonukleasen von Böhlinger Mannheim, New England Biolabs oder Gibco BRL verwendet. Für analytische Spaltungen wurden 1 µg DNA in 20 µl Reaktionsvolumen eingesetzt, wobei zur Spaltung von zur Isolation bestimmten DNA-Fragmenten 5-10 µg DNA in 40 µl Reaktionsvolumen eingesetzt wurden. Die Inkubation wurde bei 37 °C (oder entsprechend des verwendeten Enzyms auch bei 25 °C) für 1-2 h durchgeführt. Je nach Endvolumen wurden die Ansätze mit zugehörigem 10 x Inkubationspuffer sowie

2 bzw. 10 U Enzym versetzt und mit H₂O aufgefüllt. Zur Analyse der Restriktionsansätze wurden diese in der Agarosegelelektrophorese (2.2.4.4) (mit 6 x DNA-Ladepuffer [0.25 % Bromphenolblau, 0.25 % Xylencyanol, 30 % Glycerol]) aufgetrennt.

2.2.4.4 Agarosegelelektrophorese

DNA Fragmente lassen sich aufgrund ihrer negativen Ladung je nach Größe durch die Elektrophorese bei einer konstanten Spannung von 10 V / cm auftrennen. Hierzu wurden 1 % ige Agarosegele in 1 x TAE (40 mM Tris / Acetat, 1 mM EDTA, pH 8.0), versetzt mit 1 µg / ml Ethidiumbromid, verwendet. Die Auftrennung von DNA-Banden im Gel wurde fotografisch bei 254 nm festgehalten (ImageMaster[®]VDS, Pharmacia), wobei die Identifizierung und das Ausschneiden von DNA Banden, die für eine weitere Aufreinigung vorgesehen waren, auf einer Leuchtplatte mit langwelligem UV-Licht (366 nm) erfolgte. Die Extraktion solcher DNA-Fragmente aus dem Gel wurde mit Hilfe des QIAquick-Extraktionskit (Qiagen) nach Angaben des Herstellers durchgeführt.

2.2.4.5 Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die PCR ist ein temperaturreguliertes Verfahren zur Amplifikation gewünschter DNA Fragmente. Nach Aufschmelzen (bei 94 °C) der *template*-DNA kann durch die Bindung spezifischer Oligonukleotide (*Primer*) an DNA-Sequenzen die zu amplifizierende Region eingegrenzt werden. Die Primer Bindung erfolgt bei ca. 5 °C unter der jeweiligen spezifischen Schmelztemperatur T_M . Im Anschluss erfolgt die Polymerisierungsreaktion (bei 74 °C) durch hitzetolerante DNA-Polymerasen. Im Anschluss an das Aufschmelzen von DNA-*Primer*-Hybriden bei 94°C und die zyklische Wiederholung dieser Reaktion können DNA Fragmente gewünschter Länge und Sequenz exponentiell amplifiziert werden. Vorteilhaft ist, dass durch die Wahl der Primersequenzen gezielt Mutationen wie z.B. zusätzliche Restriktionsschnittstellen in die amplifizierte DNA eingebaut werden können. Der PCR-Reaktionsansatz setzte sich zusammen aus: 100 ng *template*-DNA, 0.2 mM dNTPs, je 100 pmol *Primer*, 5µl 10x PCR-Puffer und 1 U *taq*-DNA-Polymerase in einem Endvolumen von 50 µl.

2.2.4.6 Sequenzierung

Zur Überprüfung von DNA-Sequenzen wurden 1 µg Plasmid-DNA zur Sequenzierung der Microsynth AG (Balgach, Schweiz) übergeben.

2.2.4.7 Isolation viraler DNA aus infizierten Säugerzellen

Die Isolation viraler DNA aus infizierten A9 Zellen erfolgte nach der abgewandelten Methode von Hirt (Hirt, 1967). 1×10^6 infizierte Zellen wurden in PBS gewaschen, von der Kulturschale mit Trypsin abgelöst und bei 1100 x g für 5 min pelletiert. Das Zellpellet wurde in 100 µl vTE-Puffer resuspendiert und durch Zugabe von 100 µl 2 x Hirt-Extraktionspuffer (20 mM Tris, pH 7.4, 20 mM EDTA, 1.2 % SDS) lysiert. Anschließend folgte ein Verdau mit Proteinase K in einer Endkonzentration von 100 µg / ml bei 46 °C für mindestens 8 h. Bei Bedarf wurde die DNA zur Lagerung bei -20 °C eingefroren. Anschließend wurde die DNA zunächst fünf mal durch eine Spritze mit einem Kanüledurchmesser von 0.5 mm und daraufhin weitere fünf mal durch eine Spritze mit einem Kanüledurchmesser von 0.4 mm passiert, wodurch die genomische DNA mechanisch geschert wurde. Zum Nachweis der viralen Replikationsformen wurden 2 µg der DNA auf ein 0.8 % iges Agarosegel aufgetragen und mittels Southern Blot (2.2.4.8) analysiert.

2.2.4.8 DNA-Transfer (Southern Blot) und Hybridisierung mit radioaktiv markierten Sonden

Der Southern Blot beinhaltet den Transfer von zuvor in der Agarosegelelektrophorese aufgetrennter DNA auf Nitrozellulose und den spezifischen Nachweis der DNA durch die Hybridisierung mit einer markierten Sonde.

Zum Nachweis viraler DNA-Replikationsformen wurde die DNA zunächst in einem 0.8 % igen Agarosegel in 1 x TAE aufgetrennt. Zum Sichtbarmachen der DNA-Banden im UV-Licht wurde das Gel in einer 1 µg / ml Ethidiumbromid-Lösung in 1 x TAE für 30 min geschwenkt und die Lokalisation der Banden im Gel fotografisch festgehalten. Vor dem Transfer wurde das Gel anschließend 30 min in 0.25 M HCl geschwenkt. Nach Abspülen mit H₂O wurde es dann zunächst 30 min in

Denaturierungspuffer (1.5 M NaCl, 0.5 M NaOH), anschließend zweimal für 30 min in Neutralisierungspuffer (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl, pH 7.2, 1 mM EDTA) schwenkend inkubiert. Für den folgenden Transfer wurde eine Wanne mit 20 x SSC (3 M NaCl, 0.3 M *tri*-Natriumcitrat pH 7.0) gefüllt und über diese eine Glasplatte als Plattform gelegt. Als Brücke fungierten drei Lagen Whatman-Papier, welche so über die Glasplatte gelegt wurden, dass beide Enden in den Transferpuffer tauchten. Sobald sich das Papier mit dem Puffer vollgesaugt hatte, wurde auf dieses, das Gel platziert. Nicht bedeckte Papierflächen an den Seiten wurden mit Haushaltsfolie abgedichtet. Auf das Gel wurde dann eine entsprechend der Gelgröße zurechtgeschnittene und zunächst in H₂O, dann in 20 x SSC befeuchtete Nylonmembran (HybondTM-N, Amersham) luftblasenfrei aufgelegt und mit drei Lagen in 20 x SSC getränktem Whatman-Papier sowie einem Stapel trockener Papierhandtücher überschichtet. Der Blot wurde mit einem Gewicht (0.5 – 1 kg) beschwert. Nach dem DNA-Transfer über Nacht wurden die Papierhandtücher, das Whatman-Papier und das Gel entfernt. Zur kovalenten Bindung der DNA wurde die Membran mit 120 mJ UV-Licht bestrahlt (Stratalinker®, UV Crosslinker).

Zum Nachweis der DNA wurde die Membran zunächst für 1 h in Hybridisierungslösung (3 x SSC, 1 % SDS, 10 x Denhardts Lösung [50 x Denhardts Lösung: 5 % BSA, 5 % Ficoll, 5 % Polyvinylpyrrolidon auf 500 ml H₂O auffüllen], 5 mM EDTA, 100 ng / ml Heringssperma-DNA) bei 65 °C geschwenkt. Nach Zugabe der radioaktiv markierten und denaturierten Sonde (Herstellung siehe 2.2.4.9) erfolgte die Hybridisierung über Nacht bei 65 °C im Schüttelwasserbad. Anschließend wurde die Hybridisierungslösung verworfen, die Membran zweimal für 20 min in Waschlösung I (3 x SSC, 1 % SDS) und zweimal 20 min in Waschlösung II (0.3 x SSC, 1 % SDS) bei 65 °C gewaschen. Schließlich wurde die Membran luftgetrocknet, in Haushaltsfolie eingeschlagen und auf einen Röntgenfilm gelegt.

2.2.4.9 Radioaktive Markierung von DNA mit Zufallsoligomeren

Zur radioaktiven Markierung einer DNA Sonde wurde das *MegaprimeTM DNA labelling Kit* (Amersham) nach Angaben des Herstellers verwendet. Zur Identifizierung von viraler MVMP DNA wurde ein zuvor mit *BstEII* und *EcoRV* verdautes Fragment (siehe 2.2.4.3) des viralen NS1 Gens verwendet. 100 ng DNA wurden mit 5 µl *Primerlösung* (Zufallsoligomere) und H₂O auf ein Volumen von 33 µl gebracht, für 5 min auf 95 °C erhitzt und für weitere 5 min auf Eis abgekühlt. Anschließend wurden 10 µl Markierungspuffer (*labelling buffer*) mit Desoxyribonukleotiden, 5 µl [α -³²P]-dCTP (50 µCi) und 2 µl Klenow-Enzym hinzugegeben, gemischt und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 150 µl TE-Puffer zur Vergrößerung des Volumens auf 200 µl, wurden überschüssige Nukleotide durch Passieren des Ansatzes durch eine Sephadex G-50 Säule entfernt. Die Inkorporationsrate wurde mit Hilfe eines *Cerenkov Counters* bestimmt, die radioaktiv markierte DNA 5 min bei 95 °C denaturiert und schließlich zur Hybridisierung verwendet oder für maximal eine Woche bei -80 °C gelagert.

2.2.4.10 Extraktion von zellulärer RNA

Zur Extraktion von Gesamtzell-RNA wurden 5×10^6 Zellen zunächst mit PBS gewaschen und anschließend in der Kulturschale durch Zugabe von 1 ml TRIZOL für 5 min bei RT lysiert. Nach Überführung des Lysates in ein Eppendorfröhrchen und Zugabe von 200 µl Chloroform wurden die Proben zunächst ausgiebig gemischt, für weitere 2-3 min bei RT inkubiert und anschließend 15 min bei 20 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Infolge dieser Zentrifugation trennte sich die Probe in eine rote Phenol-Chloroform-Phase am Boden des Röhrchens, eine Interphase und eine farblose wässrige Phase im oberen Teil des Röhrchens, deren Volumen ca. 60 % der eingesetzten Gesamt-Trizol-Menge betrug. Diese wässrige RNA-haltige Phase wurde nun zunächst in ein neues Röhrchen überführt, mit 1 Vol 0.1 M Na-Citrat gepuffertem Phenol (pH 4.7) und 1 / 10 Vol Chloroform gut gemischt und erneut für 10 min bei 20 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Dieser Schritt diente der Beseitigung restlicher DNA- oder Proteinkontaminationen und somit der Gewinnung sehr reiner RNA-Präparationen. Zur Entfernung überschüssigen Phenols, wurde die obere wässrige Schicht nach dieser Zentrifugation mit 1 Vol Chloroform gut gemischt und

nun für 5 min bei 20 000 x g und 4 °C zentrifugiert. Die resultierende wässrige Phase wurde zur Präzipitation der RNA mit 1 Vol eiskaltem Isopropanol bei -20 °C für mindestens 1 h aber höchstens über Nacht gefällt. Das RNA-Präzipitat wurde durch Zentrifugation bei 20 000 x g für 15 min bei 4 °C pelletiert und einmal durch vorsichtiges Schütteln mit 1 ml kaltem 80 % igem Ethanol und erneutes Zentrifugieren bei 8 400 x g für 10 min bei 4 °C gewaschen. Nach Verwerfen des Überstandes wurde das Pellet kurz an der Luft getrocknet und in RNase-freiem H₂O gelöst. Die RNA wurde bei -80 °C gelagert.

2.2.4.11. Reverse Transkription-Polymerasekettenreaktion

Dieses Verfahren dient dem Nachweis von RNA Molekülen wobei diese zunächst in eine komplementäre cDNA umgeschrieben werden (reverse Transkription), die dann mittels PCR (2.2.4.5) amplifiziert wird. 1 µg RNA wurde zunächst mit 1 U / µl DNase (Gibco) nach Angaben des Herstellers mit 1 µl 10 x DNase I Reaktionspuffer in einem Endvolumen von 10 µl bei RT 15 min vorbehandelt, um eventuelle DANN-Kontaminationen zu entfernen. Die Inaktivierung der DNase erfolgte durch Zugabe von 1 µl 25 mM EDTA für 10 min bei 65 °C. Das Volumen der RNA-Proben wurde durch Zugabe von H₂O auf 15 µl erhöht und zum Vereinzeln von RNA Doppelsträngen sukzessive jeweils 5 min einer Temperatur von 70 °C, 4 °C und 25 °C ausgesetzt. Das Gesamtvolumen des Reaktionsgemisches für die reverse Transkription betrug 25 µl und setzte sich unter Berücksichtigung der Angaben der Hersteller aus den 15 µl DNase-behandelter RNA sowie 10 µl eines Reverse Transkription-Mastermixes bestehend aus 1 U Reverse Transkriptase (*M-MLV Reverse Transcriptase*, 1 U / µl, Promega), 5 µl 5 x Reverse Transkription-Puffer (Promega), 1 µl Zufallsoligomeren (*Random Hexamers*, 500 µg / ml, Promega), 0.5 µl RNase-Inhibitoren (*RNasin® Ribonuclease Inhibitor*, 40 U / µl, Promega) sowie 2.5 µl dNTP's (2.5 mM, Sigma) zusammen. Die Proben wurden nacheinander zunächst für 60 min bei 37 °C, dann 5 min bei 90 °C und abschließend 15 min bei 4 °C inkubiert. Das cDNA Produkt wurde nach Bedarf in H₂O verdünnt und bei -20 °C gelagert. Zur Amplifikation der cDNA mittels PCR (2.2.4.5) wurden in der Regel 5 µl der Probe in einem Volumen von 25 µl eingesetzt.

2.2.5 Proteinanalytik

2.2.5.1 Herstellung von Proteinextrakten

2.2.5.1.1 Gesamtproteinextrakte

Adhärenz Zellen wurden vor der Ernte mit PBS gewaschen, durch trypsinieren geerntet und bei $100 \times g$ für 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in Ripa-Puffer (20 mM Tris-HCl, pH 7.4, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0.1 % SDS, 1 % Na-deoxycholat, 1 % Triton X-100), versetzt mit einer Tablette / 50ml Proteaseinhibitoren (*Protease Inhibitor Cocktail*, Roche) und Phosphataseinhibitoren (20 mM Na-Fluorid, 5 mM β -Glycerophosphat, 5 mM *p*-Nitrophenylphosphat, 5 mM Na-Molybdat, 1 mM Na-Orthovanadat, 5 mM Na-Phosphat), resuspendiert ($100 \mu\text{l} / 10^6$ Zellen) und auf Eis 30 min inkubiert. Das resultierende Zelllysate wurde anschließend bei $20\,000 \times g$ 15 min zentrifugiert. Zelldebris formte während der Zentrifugation ein gelartiges Pellet, welches nun mit einer Pipette aus dem Extrakt entfernt werden konnte. Die Proteinextrakte wurden auf ihre Proteinkonzentration bestimmt (2.2.5.2) und anschließend bei -80°C gelagert.

2.2.5.1.2 Proteinfractionierung nach zellulären Kompartimenten

Die subzelluläre Fraktionierung von Säugerzellen erfolgte auf Grundlage abgewandelter Protokolle von Goncalves J. (Goncalves *et al.*, 1994) und Dignam J. (Dignam *et al.*, 1983) wie folgt (siehe auch Abb. 2-2). Für sämtliche beschriebene Zentrifugationen bei $> 500 \times g$ wurde eine Ultrazentrifuge (Beckman TL-100, Rotor TLS 55) verwendet.

Adhärenz Zellen wurden mit PBS gewaschen, durch Trypsinieren geerntet und bei $110 \times g$ 5 min abzentrifugiert. Das Zellpellet wurde in $1 \text{ ml} / 1 \times 10^8$ Zellen hypotonischem Puffer (10 mM Tris-HCl, pH 7.9, 1.5 mM MgCl_2 , 10 mM KCl, 0.5 mM DTT, $100 \mu\text{l} / \text{ml}$ PMSF), versetzt mit 1 Tablette / 50 ml Proteaseinhibitoren (*Protease Inhibitor Cocktail*, Roche), resuspendiert und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde dieser Gesamtzellextrakt im Glas Dounce Homogenisator (30 Hübe / 1×10^8 Zellen) homogenisiert und bei $500 \times g$ zur Separation der Zellkerne vom Zytoplasma 5 min zentrifugiert. Zur weiteren Fraktionierung der Zellkerne in Kernextrakt und

Kernmembran wurde das aus der vorherigen Zentrifugation resultierende Pellet erneut in hypotonischem Puffer aufgenommen ($500\ \mu\text{l} / 1 \times 10^8$ Zellen), in Polykarbonat Zentrifugationsröhrchen (Beckman) überführt und zunächst bei $25\ 000 \times g$ zentrifugiert um eventuelle zytoplasmatische Überreste zu entfernen. Der Überstand dieser Zentrifugation wurde verworfen, das Pellet (Fraktion P1: reine Zellkerne) in Kernpuffer (20 mM Hepes, 25 % Glycerol, 420 mM NaCl, 1.5 mM MgCl_2 , 0.2 mM EDTA, 0.5 mM PMSF, 0.5 mM DTT) resuspendiert ($500\ \mu\text{l} / 10^8$ Zellen), durch 10 Hübe im Glas Dounce Homogenisators homogenisiert, in Eppendorf

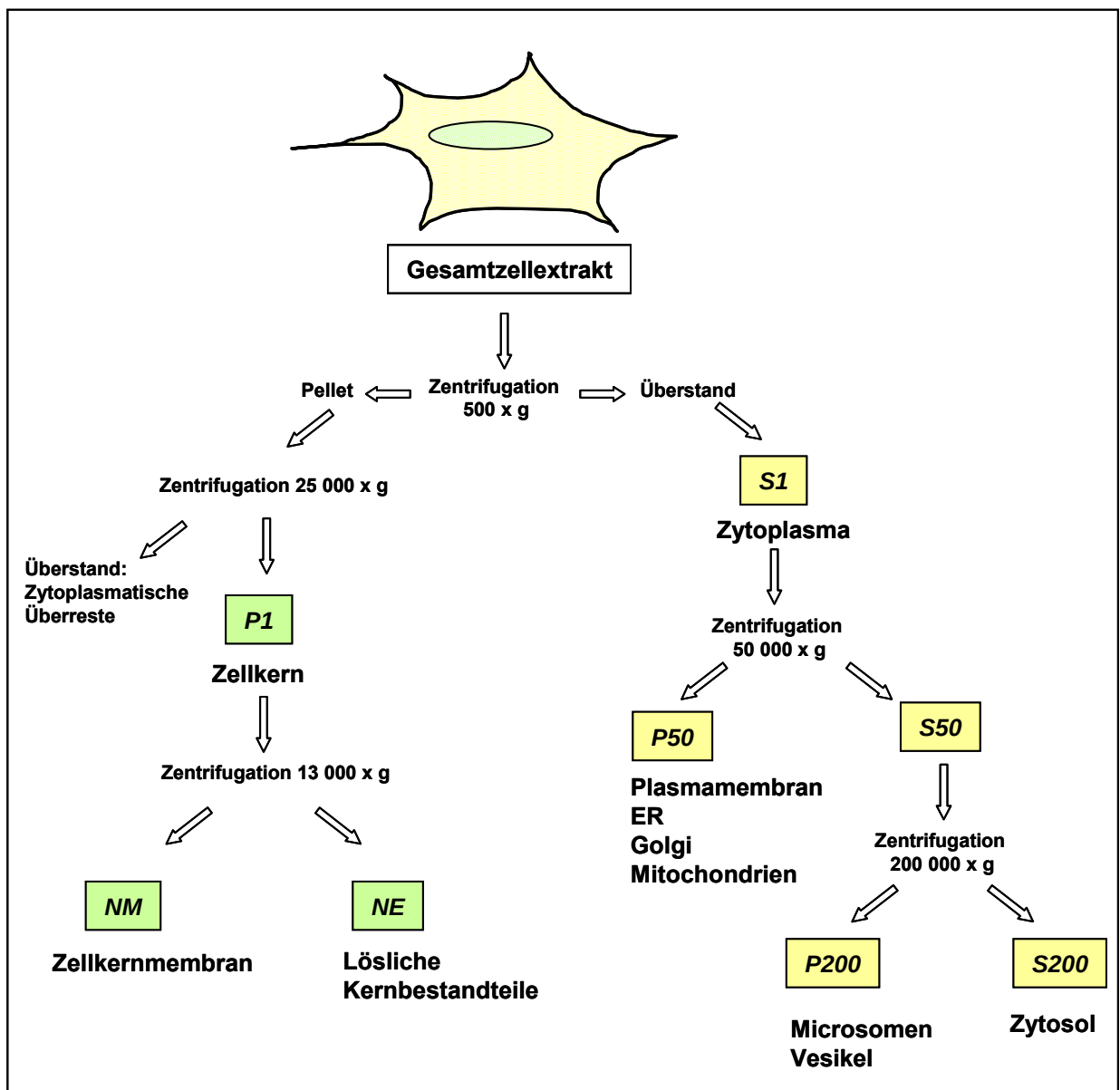


Abb. 2-2: Schematische Darstellung des Verfahrens zur Fraktionierung subzellulärer Kompartimente.

Röhrchen überführt und bei 4 °C 30 min gedreht. Der Kernextrakt wurde anschließend durch Zentrifugation bei 13 000 x g in Kernmembranen (Fraktion NM) und lösliche Kernbestandteile (Fraktion NE) separiert.

Zur weiteren Auftrennung des Zytoplasmas (Fraktion S1) wurde der in der Zentrifugation bei 500 x g gewonnene Überstand in Polykarbonat Zentrifugationsröhrchen überführt und durch Zentrifugation bei 50 000 x g 20 min weiter sedimentiert. Das resultierende Pellet wurde in hypotonischem Puffer resuspendiert (500 µl / 10⁸ Zellen) und repräsentierte die Fraktion schwerer zytoplasmatischer Membranen wie Plasmamembranen, Membranen des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgi Apparates und der Mitochondrien (Fraktion P50). Der Überstand dieses Sedimentationsschrittes (Fraktion S50) wurde durch eine letzte Zentrifugation bei 200 000 x g 60 min weiterhin in leichte zytoplasmatische Membranen wie Microsomen, Vesikel (Fraktion P200) und den rein zytosolischen Teil der Zellen (Fraktion S200) separiert. Sämtliche Fraktionen wurden bei -80 °C gelagert.

2.2.5.2 Bestimmung der Proteinkonzentration nach Bradford

Die Bestimmung der Proteinkonzentration nach der Bradford-Methode (Bradford, 1976) wurde unter Verwendung des Proteinassay-Farbreagens von BioRad durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden entsprechend verdünnte Proben des Proteinextraktes mit 1 ml des verdünnten Farbreagens (20 % in H₂O) in Messküvetten (10 x 10 x 45, Greiner) gemischt und 5 min bei RT inkubiert. Die Extinktion der Proben wurde bei 595 nm in einem Spektrophotometer (*Ultraspec 3100 pro*, Amersham) gemessen und die Proteinkonzentration durch den Vergleich zu einer Standardreihe bekannter Verdünnungen (1-12 µg / ml) des Referenzproteins Rinderserumalbumin (BSA) bestimmt.

2.2.5.3 Proteinfällung durch TCA-Präzipitation

Zur Proteinfällung aus Zellkulturüberständen wurden diese mit eiskalter Trichloressigsäure (TCA) in einer Endkonzentration von 10 % gemischt. Nach einer 30 minütigen Präzipitationsphase auf Eis wurden die gefällten Proteine bei maximaler Zentrifugationsgeschwindigkeit in einer Tischzentrifuge für 30 min

pelletiert. TCA-Reste wurden durch Waschen des Pellets mit 80 % Ethanol und nochmaligem Zentrifugieren bei maximaler Geschwindigkeit entfernt. Das Pellet wurde schließlich in Ripa Puffer resuspendiert.

2.2.5.4 sPLA₂ Anreicherung durch Heparinbindung

Zur Anreicherung sezernierter sPLA₂ aus Kulturüberständen wurden die Zellen für 2 h bei Raumtemperatur mit 50 U / ml Heparin in PBS unter Schwenken inkubiert. Anschließend wurde dieser Überstand abgenommen und für 5 min bei maximaler Geschwindigkeit zentrifugiert. Der Überstand der Zentrifugation wurde im Verhältnis 3 : 1 mit Ripa Puffer versetzt und schließlich im Western Blot analysiert.

2.2.5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE)

Zur Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wurden diskontinuierliche SDS-Polyacrylamidgele nach Lämmli (Laemmli, 1970) verwendet. Die zu analysierenden Proteine erhalten durch das im Probenpuffer enthaltene SDS eine stark negative Ladung, wodurch die Eigenladung des Proteins im Bezug auf das Laufverhalten im Gel vernachlässigbar ist. Außerdem werden durch SDS Protein-Protein-Interaktionen getrennt. Der Polyacrylamidgehalt des Trenngels variierte zwischen 8, 10, 12 und 15 %, abhängig von der Größe der zu untersuchenden Proteine (Sambrook J., 1989). Das Sammelgel setzte sich aus 30 % Acrylamidmix (29 % Acrylamid : 1 % Bisacrylamid), 1.0 M Tris-HCl, pH 6.8, 10 % SDS, 10 % Ammoniumpersulfat und 1 % TEMED zusammen. Die Gele wurden in eine mit Laufpuffer (25 mM Tris, 192 mM Glycin, 0.1 % SDS) gefüllte Kammer (BioRad) gehängt. Die Protein-Proben wurden vor dem Auftragen auf das Gel mit 2 x Lämmli-Puffer (4 % SDS, 20 % Glycerol, 10 % β -Mercaptoethanol, 100 mM Tris-HCl, pH 6.8, 2.5 % Bromphenolblau) 1 : 1 versetzt und bei 95 °C 5 min aufgekocht. Das Proben-beladenen Gel wurde mit Laufpuffer überschichtet. Die Elektrophorese der Gele einer Gesamtgröße von 18 x 20 cm erfolgte über Nacht bei 75 V und 25 mA (pro Gel). Als Molekulargewichtsmarker dienten RainbowTM (Amersham) oder Kaleidoscope Polypeptide Standards (BioRad).

2.2.5.6 Protein Transfer (Western Blot)

Die in der SDS-PAGE aufgetrennten Proteine wurden nach dem *Semi-Dry-Blot*-Verfahren mittels einer *Trans-Blot*-Apparatur (BioRad) auf eine Nitrozellulosemembran (Protran BA85, Schleicher & Schüll) übertragen (Abb. 2-3). Hierzu wurden zunächst sechs auf die Größe des Gels zugeschnittene Filterpapiere mit Blotpuffer 1 (300 mM Tris-HCl, pH 10.4, 20 % Methanol) angefeuchtet und luftblasenfrei auf die mit der Anode der Blot-Apparatur verbundene Metallplatte ausgelegt. Auf diese wurden drei weitere, zuvor in Blotpuffer zwei (25 mM Tris, pH 10.4, 20 % Methanol) getränkte, Filterpapiere geschichtet. Anschließend wurde eine in Blotpuffer 2 befeuchtete Nitrozellulosemembran platziert und auf diese wiederum das Trenngel luftblasenfrei gelegt. Den Abschluss nach oben, und somit die Verbindung zur Kathode im Deckel der Apparatur, bildete ein Stapel aus neun weiteren Filterpapieren, getränkt in Blotpuffer 3 (25 mM Tris pH 9.4, 40 mM Norleucin). Der Transfer für Trenngele der Größe 15 x 16 cm erfolgte 1.5 – 1.7 h bei 25 V und 200 mA.

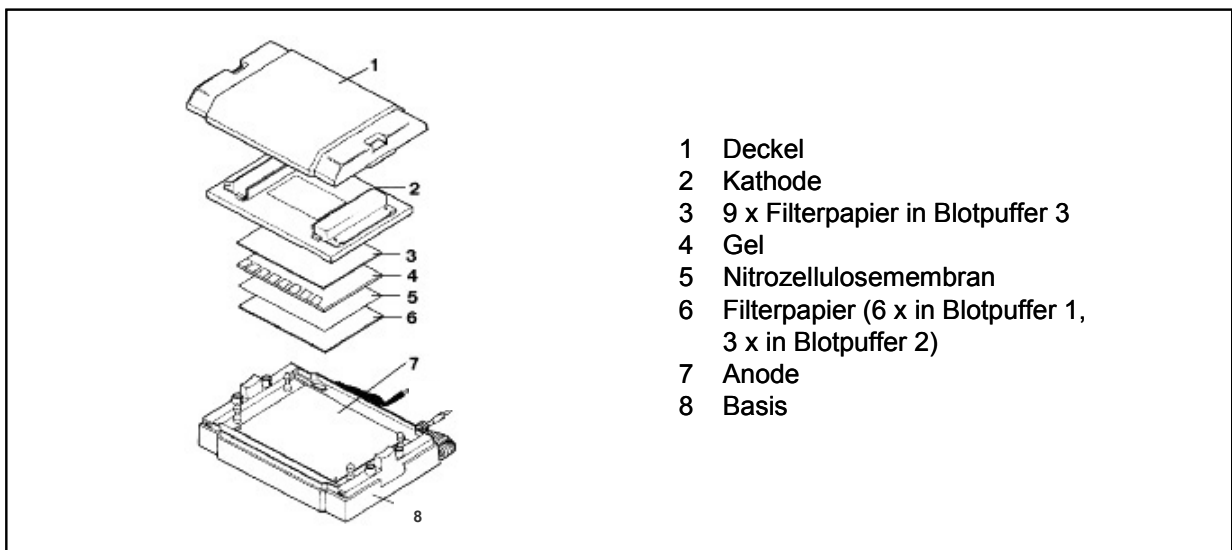


Abb. 2-3: Aufbau der Trans-Blot-Apparatur (Biorad) für den Western Blot.

2.2.5.7 Immunologischer Proteinnachweis

2.2.5.7.1 Western Blot Analyse

Die Analyse der auf Nitrozellulose transferierten Proteine erfolgte über eine Immunreaktion mit spezifischen Antikörpern. Zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen wurde die Membran im Anschluss an den Transfer zunächst für 4 h bei RT in Blocklösung (10 % Trockenmilch, 0.1 % Tween 20 in PBS) geschwenkt. Sollte die Membran zum Nachweis phosphorylierter Epitope dienen, wurden ausschließlich phosphatfreie Puffer verwendet. Die Blocklösung setzte sich in diesem Fall aus 2 % Casein, 0.1 % Tween 20 in TBS (20 mM Tris-HCl, pH 7.6, 137 mM NaCl) zusammen. Die anschließende Inkubation mit dem Primärantikörper erfolgte über Nacht bei 4 °C unter leichtem Schwenken. Hierzu wurde der Antikörper in Blocklösung bzw. zum Nachweis phosphorylierter Epitope in Primärantikörper-Verdünnungspuffer (5 % BSA, 0.1 % Tween 20 in TBS), verdünnt (2.1.8.1). Nach dem Entfernen der Primärantikörperlösung wurde die Membran mehrmals mit PBS, 0.1 % Tween 20 (bzw. TBS, 0.1 % Tween 20) gewaschen. Es folgte nun die Inkubation mit dem in Blocklösung verdünnten speziesspezifischen HRP (*horse radish peroxidase*)-konjugierten Sekundärantikörper (2.1.8.2.1) 1 h bei RT. Nach weiterem mehrmaligem Waschen in PBS, 0.1 % Tween 20 (bzw. TBS, 0.1 % Tween 20) konnten die Immunkomplexe durch eine Chemilumineszenz-Reaktion unter Verwendung des *enhanced-chemi-luminescence* (ECL)-Kits (Amersham) nach Angaben des Herstellers detektiert und durch Exposition der Membran auf einem Röntgenfilm (X-Omat AR, Kodak) sichtbar gemacht werden.

2.2.5.7.2 Immunfluoreszenz

Fixierung von Zellen auf Objektträgern (*Spot slides*)

A9 Zellen wurden steril auf *Spot slides* ausgesät (2.2.1.6) und am folgenden Tag subkonfluent in einem Inokulum von 50 µl / spot infiziert. Zur Fixierung wurden die Zellen zunächst 30 min bei RT in einer *p*-Formaldehyd Lösung (3 % *p*-Formaldehyd, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM Ca₂Cl in PBS) inkubiert. Die Fixation wurde mit einer Ammoniumchloridlösung (50 mM NH₄Cl, 1 mM MgCl₂, 0.5 mM Ca₂Cl in PBS) für

6 min bei RT unterbrochen. Durch eine anschließende Behandlung mit Permeabilisierungslösung (0.5 % Triton X-100, 1 mM MgCl_2 , 0.5 mM Ca_2Cl in PBS) wurden die Zellmembranen für die folgenden Antikörperfärbungen durchlässig gemacht. Im Anschluss an mehrmaliges Waschen mit PBS wurden die Zellen mit PBS überschichtet und bei 4 °C gelagert.

Immunfluoreszenzfärbung

Alle Arbeitsschritte in der Immunfluoreszenzfärbung der fixierten Zellen wurden in einer feuchten Kammer bei 37 °C vorgenommen. Zum Blocken unspezifischer Bindungsstellen wurden die Zelle zunächst für 1 h mit speziesspezifischem Serum inkubiert. Bei der Wahl des Blockserums war entscheidend, welcher Spezies der zu verwendende Primärantikörper abstammte, um eine Kreuzreaktion zu verhindern. Bei Verwendung von Primärantikörpern aus der Maus oder dem Kaninchen wurde 5 % iges Ziegen Serum verwendet. Stammt der Primärantikörper aus der Ziege wurde 5 % iges fetales Kälberserum (FCS) verwendet. Sowohl die Seren als auch die eingesetzten Primär- und Sekundärantikörper wurden in IF-Puffer (1 mM MgCl_2 , 0.5 mM Ca_2Cl in PBS) verdünnt. Nach dem Blocken wurden die Zellen 10 x mit PBS gewaschen und dann für 1-2 h mit der Primärantikörperverdünnung (2.1.8.1) inkubiert. Nach weiteren 10 Waschschritten folgte die Inkubation mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper (2.1.8.2.2), ebenfalls für 1-2 h. Im Anschluss wurde die DNA der Zelle zur Darstellung der Zellkerne für 5 min bei RT mit Dapi (4,6-diamidino-2-phenylindol)-Lösung angefärbt. Nach mehreren gründlichen Waschschritten wurden die Zellen mit dem Abdeckmedium Elvanol (12.5 % Polyvinylalkohol in PBS, 33 % Glycerin, bei 80 °C über Nacht lösen, Lagerung bei -20 °C) betropft und zur Fixierung der Färbung luftblasenfrei mit einer dünnen Glasplatte versehen. Nach Erstarren des Abdeckmediums konnten die Färbungen mikroskopisch ausgewertet werden. Die *Spot slides* wurden bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt.

2.2.5.7.3 Immunpräzipitation

Für die Immunpräzipitation vorgesehene Zellen wurden, wie in 2.2.5.1.1 beschrieben, geerntet, das aus der ersten Zentrifugation resultierende Zellpellet wurde jedoch in SDS-freiem Raf-Puffer (20 mM Tris, pH 8.0, 137 mM NaCl, 10 % Glycerol, 1 % Nonidet P40) aufgenommen. Zur Absättigung möglichst vieler Antikörperbindungsstellen und somit zur Verminderung der unspezifischen Bindung von Proteinen an die Protein G- bzw. A-Sepharose *beads* wurden Antikörper und *beads* zunächst vorinkubiert. Hierzu wurden 10 µl spezifischer Antikörper sowie 50 µl in Raf-Puffer equilibrierte 50 % ige Protein G- bzw. A-Sepharose Lösung für 2-4 h bei 4 °C in einem Rollkarussell gemischt. Nach dieser Vorinkubation wurde das Gemisch durch wiederholte kurzzeitige Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in einer Eppendorf Tischzentrifuge zunächst drei mal in 500 µl Raf-Puffer gewaschen und der pelletierte Sepharose-Antikörper-Komplex nun mit 100 µl Gesamtzellextrakt in 500 µl Raf-Puffer für weitere 2-4 h bei 4 °C im Rollkarussell inkubiert. Zur Entfernung ungebundener Proteine wurde das Gemisch anschließend erneut drei mal in Raf-Puffer gewaschen. Der pelletierte Sepharose-Antikörper-Komplex wurde in Ripa-Puffer (2.2.5.1.1) aufgenommen und mit 2 x Lämmli-Puffer (2.2.5.5) versetzt. Nach einer Inkubation bei 95 °C für 10 min wurden die Proben sorgfältig gemischt, um noch vorhandene Immunkomplexe zu lösen. Die Proben wurden kurz bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge für 1 min zentrifugiert und der proteinhaltige Überstand mittels SDS-PAGE (2.2.5.5) analysiert.

3. Ergebnisse

Die MVMp Infektion permissiver Zellen führt zu mannigfaltigen zellulären Veränderungen und endet schließlich mit der Lyse der Zelle. Während die virusinduzierten, sowohl auf metabolischer als auch auf morphologischer Ebene zu beobachtenden, Veränderungen zum Großteil auf Aktivitäten des viralen NS1 Proteins zurückgeführt wurden, ist der molekulare Mechanismus der Zelllyse ungeklärt. Phospholipase A₂ (PLA₂) Enzyme sind wichtige Schlüsselfaktoren in sämtlichen homöostatischen aber auch in schwerwiegenden Veränderungen an zellulären Membranen und wurden somit als Effektoren der MVMp induzierten Zelllyse in Erwägung gezogen.

3.1 Kinetik der MVMp induzierten Zelllyse und die zeitliche Korrelation mit Phospholipase A₂ Aktivität

Die virusinduzierte Zelllyse resultiert aus einem Verlust der Plasmamembranintegrität und führt folglich zur Freisetzung zytoplasmatischer Zellkomponenten in den extrazellulären Raum. Somit kann eine Bestimmung freigesetzter zytoplasmatischer Enzyme, wie Lactatdehydrogenase (LDH), quantitativen Aufschluss über die erfolgte Zelllyse geben. Um zu klären, ob PLA₂ hierzu prinzipiell einen Beitrag leisten, wurde untersucht, ob parallel zur MVMp induzierten Zelllyse auch die Freisetzung von Arachidonsäure (AA) beobachtet werden kann. Diese ist ein typisches Produkt der PLA₂ katalysierten Hydrolyse von Membranphospholipiden. Als Maß für die Zelllyse diente die Bestimmung des LDH-Gehaltes in Kulturüberständen MVMp infizierter und nicht infizierter A9 Zellen. Für die folgenden Experimente wurden die Zellen entweder mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 5 oder 20 RU (*replicative units*) / Zelle infiziert. 24 h, 48 h und 72 h nach Infektion wurden die Kulturüberstände zunächst zur LDH-Bestimmung verwendet. Wie in Abb. 3-1 A ersichtlich, konnte 48 h nach MVMp Infektion eine erhöhte LDH Menge und somit die Lyse der Zellen festgestellt werden. Zu diesem Zeitpunkt sind mit MOI 5 infizierte Zellen zu 25.9 % und mit MOI 20 infizierte Zellen zu 29.7 % lysiert. Einen Tag später, 72 h nach Infektion, kann eine deutlich erhöhte MVMp induzierte Zelllyse sowohl für die MOI 5 (39.7 %

lysierte Zellen) als auch MOI 20 (59.6 %) infizierten Zellen beobachtet werden. Die von nicht infizierten Zellen freigesetzte LDH Menge blieb mit maximal 11.7 % über den gesamten Zeitraum gering.

Zur parallelen Bestimmung einer möglichen MVMp stimulierten PLA₂ Aktivität und somit AA-Freisetzung wurden die Zellen 24 h vor der Infektion mit [³H]-markierter AA versetzt, welche bis zum folgenden Tag im Rahmen physiologischer Membranerneuerungen in die Membranphospholipide inkorporierte (siehe 2.2.1.9). Anschließend wurden die Kulturüberstände wiederum 24, 48 und 72 h nach Infektion zur Bestimmung freigesetzter [³H]-AA verwendet. Jeweils 500 µl Kulturüberstand eines jeden Ansatzes wurden im Liquid-Scintillationsgerät gemessen. Die Menge der freigesetzten AA berechnete sich aus dem Verhältnis zu einer Kontrollprobe, welche sich aus dem Gesamtkulturüberstand inklusive der trypsinisierten Zellen zusammensetzte und somit die maximal freisetzbare [³H]-AA Menge enthielt. Aus dem in Abb. 3-1 B dargestellten Diagramm wird deutlich, dass bereits 48 h nach Infektion für MOI 5 (13.9 %) und auch MOI 20 (21.7 %) infizierte Zellen eine im Vergleich zur Kontrolle (6 %) stark erhöhte Menge an [³H]-AA nachgewiesen werden kann. In den darauffolgenden 24 h stieg diese für MOI 5 infizierte Zellen auf 23.8 %,

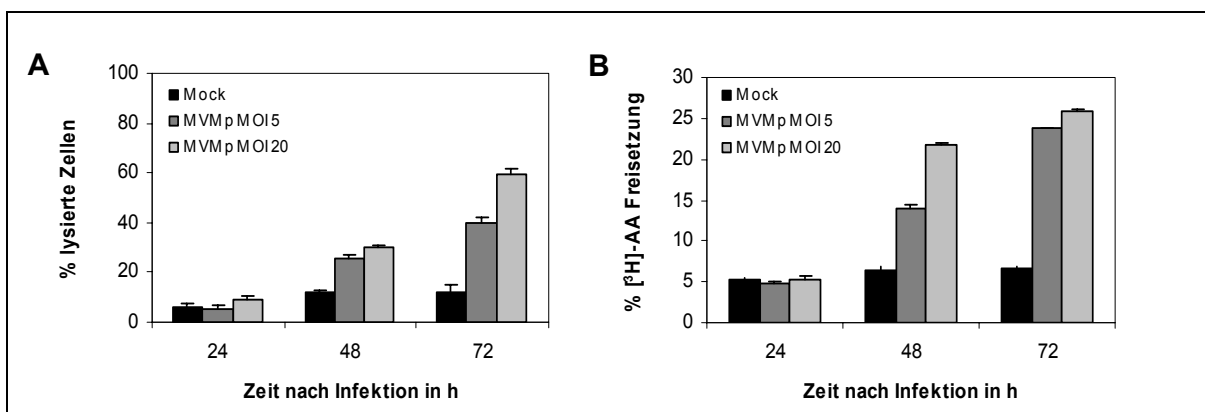


Abb. 3-1: Kinetik der MVMp induzierten Zelllyse (A) und [³H]-AA Freisetzung (B).

(A) A9 Fibroblasten wurden mit MVMp bei einer MOI von 5 (dunkelgrau) oder 20 (hellgrau) RU / Zelle oder nicht (Mock, schwarz) infiziert. 24, 48 und 72 h nach Infektion wurde die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) in den jeweiligen Kulturüberständen gemessen (siehe 2.2.1.7) und der Anteil lysierter Zellen prozentual bestimmt: % lysierte Zellen = (LDH-Aktivität im Kulturüberstand – Hintergrund LDH-Aktivität in zellfrei kultiviertem Medium) / (LDH-Aktivität im Kulturüberstand korrespondierender 100% lysierter Zellen – Hintergrund LDH-Aktivität in zellfrei kultiviertem Medium). Zur Lyse der Kontrollzellen wurden diese jeweils mit 0.9% Triton X-100 versetzt. **(B)** [³H]-AA markierte A9 Fibroblasten wurden mit MVMp bei einer MOI von 5 (dunkelgrau) oder 20 (hellgrau) RU / Zelle oder nicht (schwarz) infiziert. 24, 48 und 72 h nach Infektion wurde die Menge freigesetzter [³H]-AA in den jeweiligen Kulturüberständen gemessen (2.2.1.10) und prozentual im Verhältnis zur insgesamt inkorporierten [³H]-AA Menge (inklusive Kulturüberstand) errechnet. Sämtliche Werte stellen unter Berücksichtigung der angegebenen Standardabweichung Mittelwerte aus Triplikaten mehrerer unabhängiger Experimente dar.

für MOI 20 infizierte Zellen jedoch nur noch leicht bis auf 25.8 % an. Die von unbehandelten Zellen freigesetzte AA Menge änderte sich über den gesamten Zeitraum kaum.

Dieses Ergebnis lässt darauf schließen, dass die Infektion mit MVMP zu einer deutlich erhöhten Produktion von AA führte, die in Abhängigkeit von der MOI variierte. Unter Berücksichtigung der Beobachtung, dass sich zwischen 48 h und 72 h nach Infektion von A9 Zellen mit MVMP MOI 20 die Anzahl lysierter Zellen verdoppelt, während die Menge freigesetzter AA in diesem Zeitraum nur noch um einen geringen Teil (4.1 %) ansteigt, konnte angenommen werden, dass die virusinduzierte AA-Freisetzung der Zelllyse vorausgeht.

Um auszuschließen, dass AA als Nebenprodukt der Zelllyse anfällt, galt es zu überprüfen, ob es sich bei der AA-Freisetzung um einen MVMP induzierten, enzymatisch regulierten Prozess handelt. Da AA unter anderem als Substrat für Cyclooxygenasen und somit der Synthese nachgeschalteter Effektormoleküle, wie beispielsweise Prostaglandinen dient, konnte die Entstehung von PGE₂ den Nachweis über den Ablauf eines MVMP induzierten, mit dem AA-Metabolismus assoziierten Prozesses erbringen. Somit wurde unter Verwendung eines Prostaglandin E₂ (PGE₂) EIA (*enzyme immunoassay*) in einer weiteren Zeitkinetik die Produktion und Ausschüttung dieses Eicosanoids in MVMP infizierten Zellen verfolgt und quantifiziert (Abb. 3-2). Wie aus dem Diagramm zu entnehmen ist, konnte infolge der MVMP Infektion ein starker Anstieg in der PGE₂-Freisetzung verzeichnet werden. Während 24 h nach Infektion zunächst keine Zunahme zu beobachten war, stieg die PGE₂ Konzentration innerhalb der folgenden 24 h um das sechsfache auf 44.6 ng / ml und gipfelte wiederum 24 h später in 182.5 ng / ml, wobei die PGE₂ Menge in den Kulturüberständen unbehandelter Zellen zu allen drei Zeitpunkten mit ca. 8 ng / ml gering blieb.

Die zeitliche und quantitative Korrelation MVMP induzierter Zelllyse, mit der AA- und PGE₂-Freisetzung hätte zunächst vermuten lassen können, dass es sich bei den ermittelten PGE₂ Mengen im Kulturüberstand um intrazellulär vorhandenes, nur durch die virusinduzierte Permeabilisation der Zelle freigesetztes PGE₂ handelte.

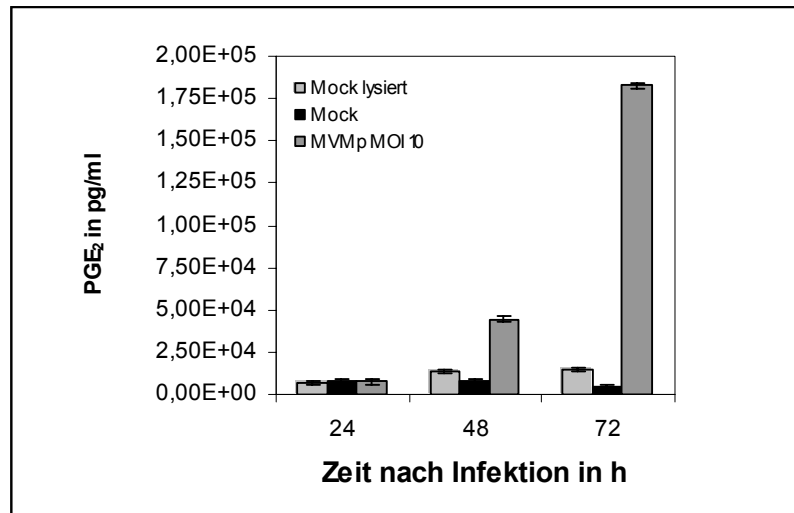


Abb. 3-2: Kinetik der MVMp induzierten PGE₂-Produktion.

A9 Fibroblasten wurden mit MVMp bei einer MOI von 10 (dunkelgrau) RU/Zelle oder nicht (Mock, schwarz und weiß) infiziert. 24 h, 48 h und 72 h nach Infektion wurde die PGE₂-Konzentration in den jeweiligen Kulturüberständen unter Verwendung eines PGE₂ EIA bestimmt und mithilfe einer Standardkurve berechnet. Zur Bestimmung der theoretisch maximal freisetzbaren PGE₂ Menge in Mock infizierten Zellen wurden diese vor der jeweiligen Messung durch Behandlung mit 0.9 % Triton X-100 lysiert (weiß).

Um diese Vermutung auszuschließen wurden nicht infizierte Zellen 24 h, 48 h oder 72 h nach Infektion mit Triton-X 100 vollständig lysiert und die Gesamtmenge an PGE₂ bestimmt. Die berechneten Konzentrationen sind in das Diagramm in Abb. 3-2 integriert und zeigen eindeutig, dass die in nicht infizierten Zellen vorhandene Gesamt- und somit maximal freisetzbare PGE₂-Menge mit 6.8 ng / ml nach 24 h, 13.7 ng / ml nach 48 h und 14.8 ng / ml nach 72 h durchweg gering blieb, währenddessen im Vergleich MVMp infizierte Zellen bis 72 h nach Infektion eine mehr als 12-fach höhere PGE₂ Menge gegenüber nicht infizierten Zellen produzierten.

Dieses Ergebnis unterstrich die virusspezifische Stimulation der Produktion und Freisetzung von AA und PGE₂. Es bestätigte außerdem die Annahme, dass diese Vorgänge der virusinduzierten Zelllyse vorausgehen.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass die demonstrierten Ergebnisse für eine MVMp stimulierte, enzymatische PLA₂ Aktivität sprechen. Aufgrund der zeitlichen Korrelation dieser virusspezifischen PLA₂ Aktivität und der Zelllyse kann vermutet werden, dass beide Prozesse im Zusammenhang stehen. Im Folgenden war es von großem Interesse klarzustellen, inwiefern die kürzlich im Kapsidprotein VP1

entdeckte parvovirale PLA₂ Domäne Anteil am beobachteten Phänomen haben könnte. Diese Fragestellung wird im Folgenden Abschnitt untersucht.

3.2 Rekombinante MVMp Viren als Vektoren für die kombinierte Expression von NS Proteinen und der parvoviralen PLA₂ Domäne

Zur Untersuchung einer möglichen Beteiligung der parvoviralen PLA₂ an der virusinduzierten Wirtszelllyse, wurden rekombinante MVMp Viren verwendet, welche für die viralen NS Proteine und die PLA₂ Domäne des VP1 Proteins kodierten.

Die parvovirale PLA₂ wurde als erste viruskodierte PLA₂ identifiziert. Sie ist in dem für das Kapsidprotein VP1 spezifischen N-terminalen Bereich (VP1nt) lokalisiert, welcher im intakten Kapsid im Innern verborgen liegt, unter bestimmten Bedingungen aber externalisiert werden kann (Cotmore *et al.*, 1999). Die parvovirale PLA₂ Domäne befindet sich innerhalb einer Region von 40 Aminosäuren, die bei der Mehrheit der Parvoviren zu 90 % sequenzidentisch ist (Zadori *et al.*, 2001). Teile dieser Aminosäuresequenz stimmen mit denjenigen Aminosäuresequenzen überein, die für die hydrolytische Aktivität der zellulären sekretorischen PLA₂ (sPLA₂) nachweislich wichtig sind. Dies ist zum einen das Motiv HDXXY in der katalytischen Region und zum anderen das Motiv YXGXG in der Ca²⁺-Bindungsdomäne. Interessanterweise zeigen die Sequenzen außerhalb dieses Motivs in VP1nt kaum Ähnlichkeit mit der Sequenz des zellulären Enzyms. Durch Untersuchungen mit rekombinanten VP1nt Fusionsproteinen konnte gezeigt werden, dass insbesondere die Mutation der HD Reste zu einer starken Beeinträchtigung der enzymatischen PLA₂ Aktivität führt (Zadori *et al.*, 2001). An diesen Positionen mutierte Viren binden zwar an den Rezeptor und werden endozytotisch in die Zelle aufgenommen, akkumulieren jedoch perinukleär im späten Endosomen und gelangen nicht in den Zellkern. Diese Beobachtung lässt schlussfolgern, dass die parvovirale PLA₂ eine entscheidende Funktion in der Überführung der viralen DNA vom späten Endosom in den Zellkern hat, auch wenn bisher keine Ausschüttung von Arachidonsäure *in vivo* zu einem frühen Zeitpunkt im viralen Infektionszyklus beobachtet werden konnte.

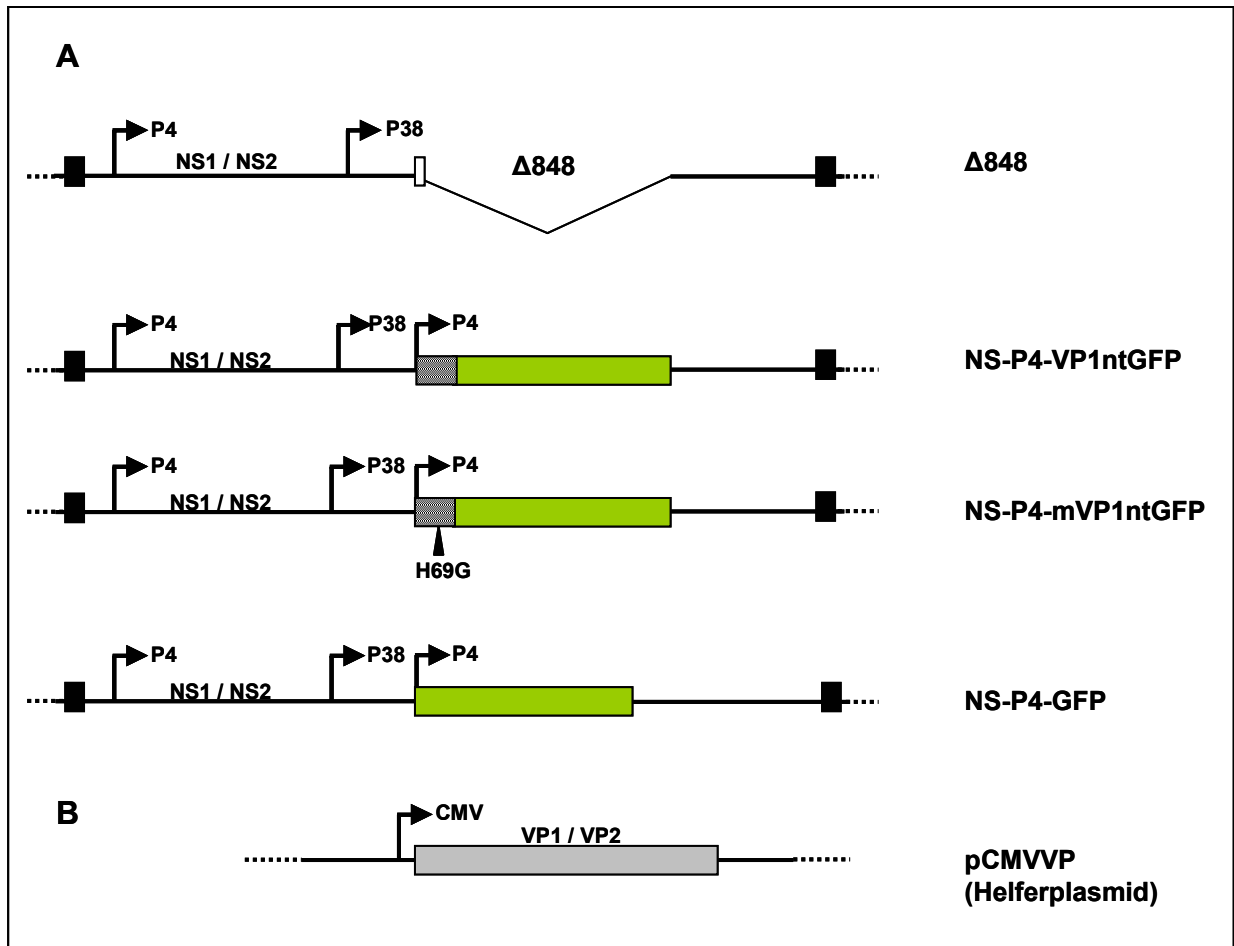


Abb. 3-3: Schematische Darstellung der rekombinanten MVMP Vektoren.

(A) Die rekombinanten MVMP Vektoren liegen doppelsträngig in einem pUC19-Plasmid vor. Ausgehend vom infektiösen DNA Klon pdBMVp wurden 848 bp der VP-kodierenden Sequenz deletiert. Über eine eingeführte multiple Klonierungsstelle (□) wurde das jeweilige Transgen einkloniert. Sowohl die für die NS Proteine kodierenden Sequenzen, als auch für die Replikation wichtige Palindrome (■), und die viralen Promotoren P38 und P4 bleiben erhalten. Den Transgenen ist ein zusätzlicher P4 Promotor vorgeschaltet. Sie kodieren für das jeweilige VP1nt (■), mit oder ohne H69G Mutation, in Fusion mit EGFP (■) oder nur für EGFP. **(B)** Zur Produktion rekombinanter Viren müssen die Kapsidproteine VP1 und VP2 in *trans* durch Kotransfektion mit einem Helferplasmid zur Verfügung gestellt werden. Die Transkription der Gene für VP1 und VP2 (□) verläuft unter Kontrolle eines CMV-Promotors.

In den in der vorliegenden Arbeit verwendeten rekombinanten Viren sollte die Mutation des HD Motivs (H69G) in VP1nt Aufschluss über eine Relevanz der katalytischen Aktivität der parvoviralen PLA₂ in der virusinduzierten Zellyse geben.

3.2.1 Produktion und Titration der rekombinanten MVMP Viren

Zur Produktion drei verschiedener rekombinanter MVMP Viren wurden die rekombinanten Vektorkonstrukte, schematisch dargestellt in Abb. 3-3 A, von J. Nüesch zur Verfügung gestellt. Ausgehend vom infektiösen MVMP Klon pdBMVp (Kestler *et al.*, 1999) wurden 848 bp der Kapsidprotein-kodierenden Sequenz

deletiert und mithilfe einer multiplen Klonierungsstelle durch je ein Transgen ersetzt. Die hier verwendeten Transgene kodierten für wildtyp VP1nt in Fusion mit EGFP (enhanced green fluorescent protein), im Folgenden benannt mit NS-P4-VP1ntGFP oder kodierten für VP1nt mit einer H69G Mutation, in Fusion mit EGFP, benannt mit NS-P4-mVP1ntGFP. Ein Kontrollvektor enthielt als Transgen ausschließlich die Sequenz für EGFP, im Folgenden bezeichnet mit NS-P4-GFP. Die Fusion des VP1nt mit EGFP sollte einerseits die Stabilität der viralen PLA₂ erhöhen (Zadori *et al.*, 2001) und andererseits die einfache Detektion von mit rekombinantem Virus infizierten Zellen ermöglichen. Zur Expressionsverstärkung wurde dem jeweiligen Transgen außerdem ein zusätzlicher P4 Promotor vorgeschaltet. Durch eine Deletion des für die Kapsidproteine des Virus kodierenden Bereiches, wurde den Viren einerseits die Fähigkeit genommen neue Nachkommenviren zu verpacken, andererseits blieben ihnen aber sämtliche für die

DNA-Replikation und Expression essentiellen Bereiche erhalten (Kestler *et al.*, 1999), sowie sämtliche durch die NS Proteine regulierten Aktivitäten.

Zur Produktion der Viren musste allerdings ein sogenanntes Helferplasmid (pCMVVP) (Abb. 3-3 B), entwickelt von C. Kornfelder (Diplomarbeit, 1997),

kotransfiziert werden (Abb. 3-4). Das Helferplasmid

kodierte, unter Kontrolle des frühen Cytomegalie Virus (CMV) Promotors, die VP1 und VP2 Proteine von MVMp.

Es enthielt außerdem einen SV40 Replikationsursprung.

Zur Transfektion wurden

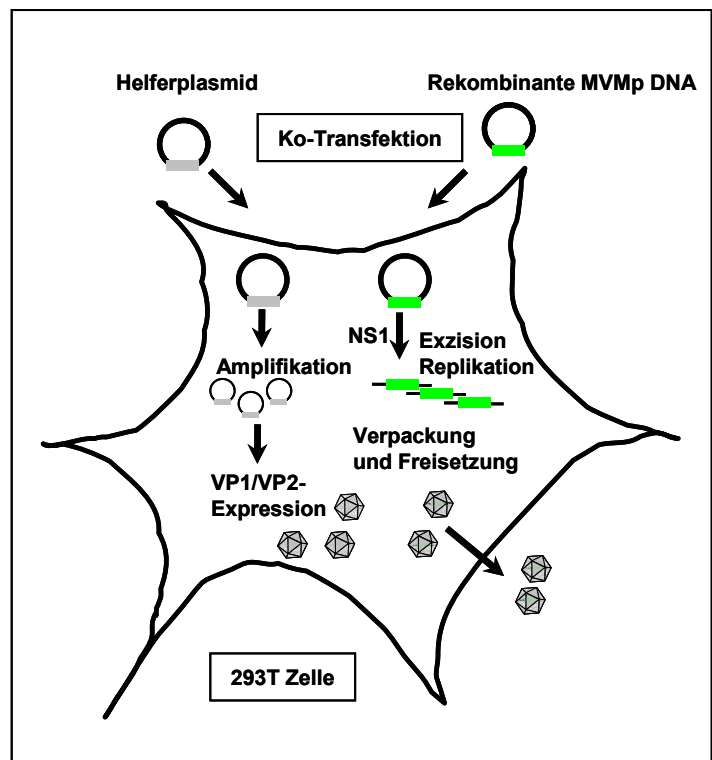


Abb. 3-4: Schematische Darstellung der Produktion rekombinanter MVMp Viren.

Das rekombinante, Transgen kodierende MVMp Plasmid (○) und das die Kapsidproteine kodierende Helferplasmid (○) wurden nach der CaPO₄-Methode in 293T Zellen kotransfiziert (siehe 2.2.2.1). Während das rekombinante Virusgenom ausgeschnitten und unter Einfluss von exprimiertem NS1 repliziert wird, wird das Helferplasmid zunächst amplifiziert. Nach Expression der VP1/VP2 Proteine und Assemblierung zu Kapsiden, wird die rekombinante Virus DNA in diese verpackt. Schließlich werden die Viren freigesetzt.

293T Zellen (transformiert mit SV40 großem T-Antigen) verwendet.

Nach der Transfektion wird zunächst das NS1 Protein exprimiert. NS1 schneidet dann das rekombinante Virusgenom aus dem Plasmid und reguliert anschließend dessen Replikation. Zeitgleich wird mit Hilfe des T-Antigens der 293T Zellen und des SV40 Replikationsursprungs das Helferplasmid amplifiziert. Es folgt die Expression der Kapsidproteine, die dann zu Kapsiden assemblieren, in welche schließlich die amplifizierte virale DNA verpackt wird. Die Ernte der so produzierten rekombinanten Viren erfolgte zwischen 2 und 3 Tagen nach der Transfektion vor Beginn der Zelllyse.

Aufgrund von Sequenzhomologien zwischen rekombinantem und Helferplasmid kann es während der Virusproduktion zu Rekombinationen in diesen homologen Bereichen kommen. Dabei rekombiniert die für das Kapsidprotein kodierende Sequenz aus dem Helferplasmid in das rekombinante Virusgenom und es entstehen Viren mit Wildtypgenom. Der Anteil dieser Wildtypviren in einer Präparation rekombinanter Viren, unter Verwendung der beschriebenen Vektoren, beträgt normalerweise zwischen 0.1 % und 1.0 % (Kestler *et al.*, 1999; Haag *et al.*, 2000).

Zur Aufreinigung und Konzentration der produzierten Viren wurden jeweils 20 ml vTE-Zelllysat aus ca. 10^8 Zellen über Iodixanolgradienten aufgetrennt (siehe 2.2.2.2).

Zur Titration der produzierten rekombinanten MVMp Viren wurden A9 Zellen infiziert. Zur Virustitration mithilfe des Plaque-Assays (2.2.2.4.1) ist es notwendig, dass nach Infektion Nachkommenviren produziert werden, die wiederum benachbarte Zellen infizieren können. Dies ist der Fall bei Wildtypviren. Die zuvor beschriebenen rekombinanten Viren bilden jedoch keine Nachkommenviren und können somit auch keine Plaques bilden. Zur Bestimmung der Virustiter wurde hier deshalb der Hybridisierungs-Assay angewandt. Mithilfe dieser Methode kann auch die virale DNA-Replikation in infizierten Zellen nachgewiesen werden. Wie in 2.2.2.4.2 beschrieben, wurden die virale DNA zur Detektion auf Nitrozellulosefiltern immobilisiert, denaturiert, und anschließend mit einer [^{32}P]-markierten DNA-Sonde hybridisiert. Für die Hybridisierung von DNA des Wildtypvirus wurde eine spezifische MVMp NS-Sequenz, zum Nachweis der rekombinanten Virus DNA wurde hingegen eine EGFP spezifische DNA-Sequenz verwendet. Falsch-positive Signale, von möglicherweise durch homologe Rekombination entstandener Wildtypviren,

	NS-P4-GFP			NS-P4-VP1ntGFP			NS-P4-mVP1ntGFP		
Hybridisierungs-Assay									
Plaque-Assay									
Verdünnung	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}	10^{-2}	10^{-4}	10^{-6}
Titer in RU/ml	7×10^7			1×10^8			5×10^7		
Wildtyp Kontamination in %	0,7			0,002			0,003		

Abb. 3-5: Titration der rekombinanten MVMP Viren.

Zur Bestimmung des replikativen Titors der produzierten und aufgereinigten rekombinanten Viren NS-P4-GFP, NS-P4-VP1ntGFP und NS-mVP1ntGFP, sowie des prozentualen Anteils kontaminierender Wildtypviren, wurden A9 Zellen mit jeweils seriellen Verdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-8} infiziert und zum einen für den Hybridisierungsassay (2.2.2.4.2) und zum anderen für den Plaque-Assay (2.2.2.4.1) verwendet. Repräsentative, [^{32}P]-markierte Filter des Hybridisierungsassays sind jeweils für die Verdünnungen 10^{-2} , 10^{-4} und 10^{-6} dargestellt. Hieraus ergaben sich die aufgezeigten Titer in RU / ml. Auch für den Plaque-Assay sind die Ergebnisse der Virusverdünnungen 10^{-2} , 10^{-4} und 10^{-6} gezeigt. Die errechneten prozentualen Werte stellen Mittelwerte mehrerer Virusproduktionen dar.

konnten so vermieden werden. Um den prozentualen Anteil dieser Wildtypviren abschätzen zu können, wurde jede Viruspräparation parallel zum Hybridisierungsassay auch im Plaque-Assay eingesetzt. Das Ergebnis dieser zwei Methoden ist in Abb. 3-5 gezeigt.

In beiden Methoden wurden Virusverdünnungen von 10^{-1} bis 10^{-8} getestet. Repräsentativ sind nur die Verdünnungen 10^{-2} , 10^{-4} und 10^{-6} abgebildet. Die Berechnung (siehe 2.2.2.4.2) ergab für die NS-P4-VP1ntGFP Präparation einen Titer von 1×10^8 , für die NS-P4-mVP1ntGFP Präparation einen Titer von 5×10^7 und für die Präparation des Virus NS-P4-GFP einen Titer von 7×10^7 RU / ml. Alle Titer lagen im Bereich anderer Präparationen rekombinanter Viren (Kestler *et al.*, 1999; Lang *et al.*, 2005). Der Plaque-Assay ergab eine Kontamination mit Wildtypviren von höchstens 1 %. Zur Berechnung dieses Anteils wurde die ausgezählte Menge sichtbarer Plaques einer definierten Virusverdünnung mit dem jeweiligen Titer (RU / ml) aus dem Hybridisierungsassay ins Verhältnis gesetzt. Die an Abb. 3-5 aufgezeigten Werte stellen Mittelwerte verschiedener Viruspräparationen dar.

3.2.2 Expression und Replikation der rekombinanten MVMP Viren

Die Charakterisierung der rekombinanten MVMP Viren erfolgte nach Infektion von A9 Fibroblasten. Von Interesse war, ob die jeweiligen Fusionsproteine VP1ntGFP bzw. mVP1ntGFP nach Infektion durch die rekombinanten Viren als solche exprimiert werden konnten. Zunächst wurden zur Bestimmung der EGFP-Transduktionseffizienz A9 Zellen auf *spot slides* mit NS-P4-GFP, NS-P4-VP1ntGFP oder NS-P4-mVP1ntGFP infiziert. 36 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert und die zelluläre DNA mit Dapi angefärbt. Die EGFP Expression wurde im Fluoreszenzmikroskop bei einer Anregung von 488 nm dokumentiert. Abb. 3-6 A veranschaulicht beispielhaft den prozentualen Anteil EGFP positiver Zellen. Er betrug im gezeigten Fall für NS-P4-GFP infizierte Zellen 20 %, für NS-P4-VP1ntGFP infizierte Zellen 15.8 % und für NS-P4-mVP1ntGFP infizierte Zellen 19.05 %. Im Mittel konnte für alle drei rekombinanten MVMP Viren bei einer Infektion mit MOI 10 RU / Zelle eine Transduktionsrate von 18 % erreicht werden.

Die Expression von EGFP in Fusion mit VP1nt oder mVP1nt wurde in Gesamtzellproteinextrakten nach wildtyp MVMP Infektion oder Infektion mit den rekombinanten MVMP Viren im Western Blot untersucht (Abb. 3-6 B). Zur Detektion der Fusionsproteine wurde zum einen ein EGFP spezifisches Antiserum und zum anderen ein Antiserum verwendet, welches die N-terminale Domäne des Kapsidproteins VP1 bindet. Mithilfe eines NS1 spezifischen Antikörpers konnte die NS1 Expression in allen vier infizierten Versuchsansätzen nachgewiesen werden. Die vergleichsweise größere NS1 Menge in MVMP infizierten Zellen kann wahrscheinlich auf die nach anderthalb Tagen erfolgte Reinfektion benachbarter Zellen durch MVMP zurückgeführt werden. Die Inkubation des Western Blots mit EGFP spezifischem Antiserum führte zur Detektion von EGFP in NS-P4-GFP infizierten Zellen, ca. 27 kDa, sowie zur Detektion des jeweiligen EGFP-Fusionsproteins (ca. 41 kDa) in NS-P4-VP1ntGFP bzw. NS-P4-mVP1ntGFP infizierten Zellen. Die durch Nachweis des Fusionsproteins sichtbaren Banden wurden durch die Inkubation eines unabhängigen Blots mit dem VP1nt spezifischen Antikörper bestätigt. Ferner wird in den Proteinextrakten sämtlicher virusinfizierter Zellen bei Verwendung dieses Antikörpers eine weitere Bande bei ca. 85 kDa sichtbar. Diese ist wahrscheinlich auf die Bindung des Antikörpers an aus

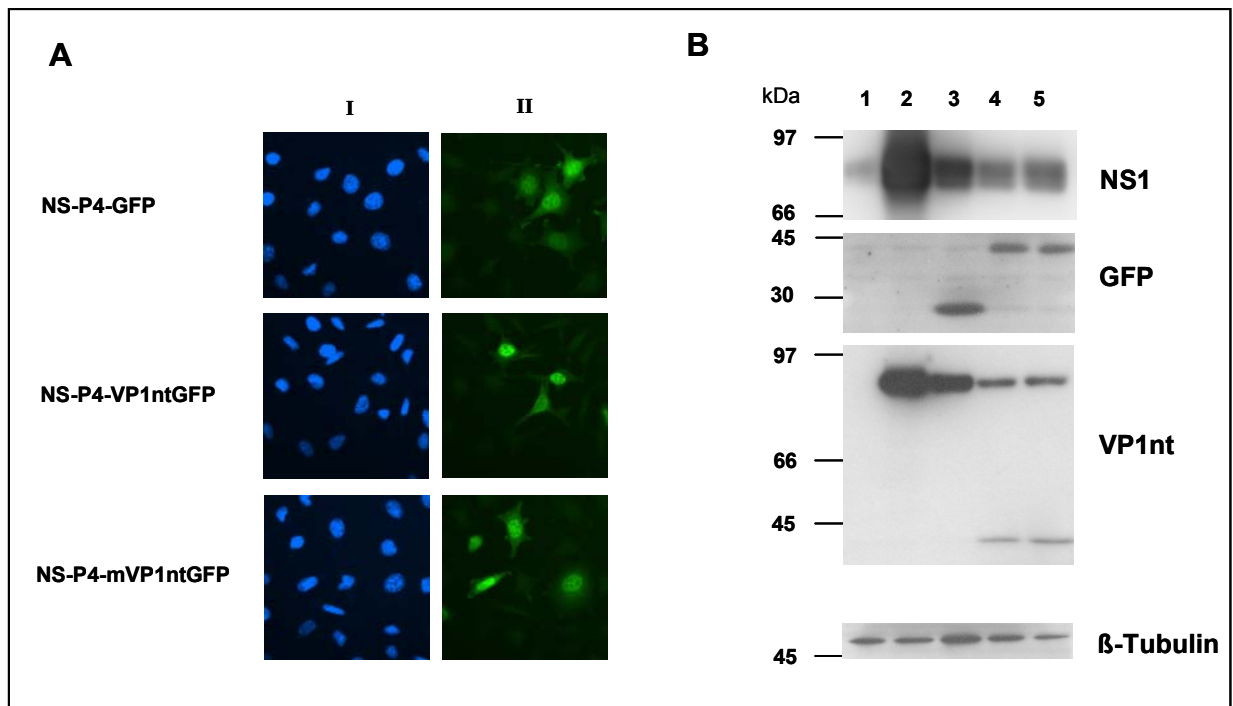


Abb. 3-6: Transduktion von GFP sowie viraler Proteine durch rekombinante MVMP Viren.

(A) A9 Zellen wurden auf *spot slides* ausgesät, mit MOI 10 RU / Zelle infiziert und 36 h nach Infektion fixiert. Zelluläre DNA wurde mit Dapi angefärbt (I). Die Transduktion von EGFP (II) durch die rekombinanten Viren wurde durch Fluoreszenzmikroskopie bei 40facher Vergrößerung dokumentiert. Die Anregung der Dapi-Fluoreszenz erfolgte bei 358 nm, die Anregung der EGFP Fluoreszenz bei 488 nm. **(B)** A9 Zellen wurden mit MOI 10 RU / Zelle infiziert und 36 h nach Infektion für die Proteinextraktion geerntet. 20 µg Protein wurden in einer 10%igen SDS PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Als Molekulargewichtsstandard diente der RainbowTM-Marker (Amersham). Verwendete Antisera (siehe auch 2.1.8) sind auf der rechten Seite der Abbildung benannt. 1: nicht infiziert (Mock), 2: wildtyp MVMP, 3: NS-P4-GFP, 4: NS-P4-VP1ntGFP, 5: NS-P4-mVP1ntGFP.

infizierenden Kapsiden stammendem VP1 zurückzuführen. Auch bezüglich dieser Bande war anzunehmen, dass die stärkere Intensität in MVMP infizierten Zellen aus einer nach 36 h bereits erfolgten Reinfektion durch Nachkommenviren hervorging. Quantitative Unterschiede von NS1 bzw. VP1 (siehe 85 kDa Bande bei Detektion mit VP1nt Antikörper in Abb. 3-6 B) im Vergleich der rekombinanten Viren korrelieren mit der zuvor bestimmten Kontamination der Viruspräparationen mit wildtyp MVMP.

Die Analyse der Replikation der rekombinanten Viren im Vergleich zu wildtyp MVMp erfolgte mithilfe des Southern Blots (siehe 2.2.4.9.). Zu diesem Zweck wurde die virale DNA 36 h nach Infektion nach der abgewandelten *Hirt*-Methode (siehe 2.2.4.8) aus den Zellen isoliert, auf Nitrozellulose transferiert und mithilfe einer spezifischen [³²P]-markierten DNA-Sonde nachgewiesen (Abb. 3-7). Während sowohl die monomeren (mRF) als auch dimeren Replikationsintermediate (dRF) in allen vier Ansätzen infizierter Zellen nachweisbar sind, konnte die einzelsträngige Virion-DNA (ssDNA) nur in wildtyp MVMp

infizierten, nicht aber in den mit rekombinantem MVMp infizierten Zellen festgestellt werden. Dieses Ergebnis entsprach der Erwartung, da bekannt ist, dass die Synthese der ssDNA sehr streng an den durch Kapsidproteine regulierten Verpackungsprozess von Nachkommenviren assoziiert ist (Rhode, 1976; Richards *et al.*, 1977; Tullis *et al.*, 1993) und die hier verwendeten rekombinanten Viren keine neuen Kapside und somit auch keine Nachkommenviren produzieren können. Weiterhin sind in Abb. 3-7 die Unterschiede in den Genomgrößen zwischen den rekombinanten Viren gut zu erkennen. Wildtyp MVMp enthielt in diesem Fall das längste Genom, während diejenigen der Rekombinanten deutlich kleiner waren. Unter ihnen gleichen sich die Genome der zwei Vertreter, die für das VP1ntGFP bzw. mVP1ntGFP Fusionsprotein kodierten, da sie um die VP1nt Sequenz (ca. 430 bp) länger waren als NS-P4-GFP.

Rekombinante MVMp Viren, welche die parvovirale PLA₂ in Fusion mit EGFP exprimieren, konnten also durch Kotransfektion in 293T Zellen produziert werden.

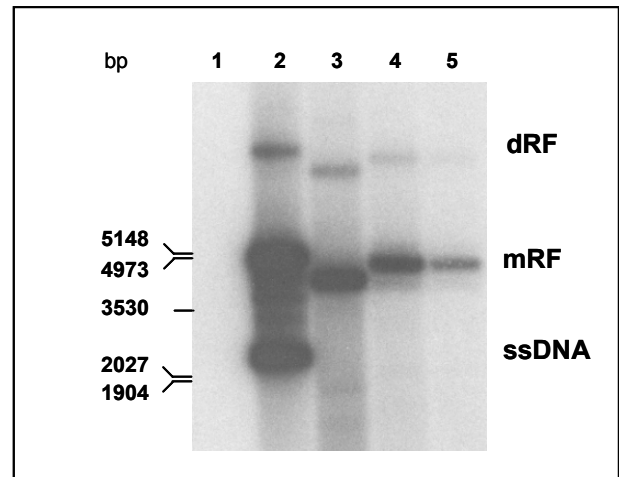


Abb. 3-7: Replikation der rekombinanten Viren.

A9 Zellen wurden mit MOI 10 RU / Zelle infiziert und 36 h nach Infektion für die Extraktion viraler DNA geerntet. 2.5 µg DNA wurden zum Nachweis viraler Replikationsintermediate aufgetrennt und im Southern Blot (2.2.4.9) mit einer NS-spezifischen Sonde nachgewiesen. Als Molekulargewichtsstandard diente *Hind*III/*Eco*RI verdaute λ DNA. 1: nicht infiziert (Mock), 2: wildtyp MVMp, 3: NS-P4-GFP, 4: NS-P4-VP1ntGFP, 5: NS-P4-mVP1ntGFP.

dRF: dimere replikative Form, mRF: monomere replikative Form, ssDNA: einzelsträngige Virion-DNA

Die Kontamination mit wildtyp MVMP Viren, die aus homologen Rekombinationsereignissen hervorgingen, lag im Durchschnitt bei $< 1\%$. Die biochemische Charakterisierung der rekombinanten Viren im Vergleich zu wildtyp MVMP ließ erkennen, dass alle Viruskonstrukte die Akkumulation vom NS1 Protein und der durch die Rekombinanten kodierten Fusionsproteine 36 h nach Infektion bewirken. Eine Analyse der viralen Replikation veranschaulichte den im Vergleich zu Wildtypviren für rekombinante MVMP Viren typischen Defekt in der Synthese von viraler Nachkommen-DNA.

Von besonderem Interesse war es nunmehr die produzierten rekombinanten Viren hinsichtlich der virusinduzierten Zelllyse zu untersuchen.

3.2.3 Lytisches Potential der rekombinanten MVMP Viren und AA-Freisetzung

Die Quantifizierung des zytolytischen Potentials der produzierten rekombinanten MVMP Viren erfolgte mithilfe des LDH-Assays. A9 Zellen wurden mit einer MOI von 10 RU / Zelle wildtyp MVMP oder jeweils einem der drei rekombinanten Viren infiziert. Zur Abschätzung einer möglichen Hintergrund-Aktivität durch kontaminierende wildtyp MVMP Viren in den Präparationen der Rekombinanten, wurden zusätzliche Zellpopulationen mit einer wildtyp MVMP MOI, entsprechend des zuvor berechneten maximalen Kontaminationsanteils von ca. 1 %, infiziert.

Das Maximum der MVMP induzierten Zelllyse bei einer Infektion mit MOI 10 RU / ml trat, wie in Abb. 3-1 deutlich wurde, nicht vor Beginn des dritten Tages nach Infektion ein. Es musste davon ausgegangen werden, dass produzierte Nachkommenviren zu diesem Zeitpunkt die Wirtszelle bereits verlassen und neue Zellen infiziert haben. Durch Zugabe von Neuraminidase, welche Glykosylierungsgruppen von Zelloberflächenmolekülen spaltet, kann eine Reinfektion verhindert werden (Cotmore und Tattersall, 1987). Mit der Behandlung von wildtyp MVMP infizierten Zellen mit 0.1 U / ml Neuraminidase unmittelbar nach Infektion, war es demnach möglich, Effekte einer einzigen Infektionsrunde des Virus zu betrachten und somit vergleichbare Bedingungen zum Infektionszyklus rekombinanter Viren zu schaffen.

Das Ergebnis der Analyse des lytischen Effektes der rekombinanten im Vergleich zu wildtyp MVMP Viren ist in Abb. 3-8 A dargestellt. Drei Tage nach Infektion war zu

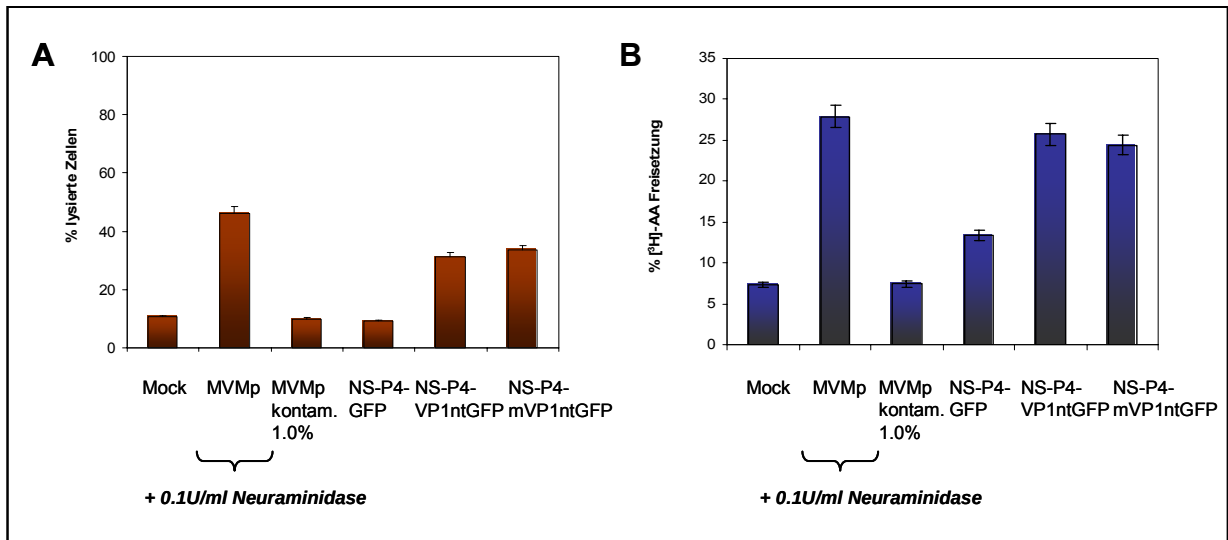


Abb. 3-8: Lytischer Effekt und Freisetzung von [³H]-AA nach Infektion mit rekombinanten MVMP Viren.

A9 Zellen wurden mit wildtyp MVMP bzw. rekombinantem MVMP bei einer MOI von 10 RU / Zelle oder nicht (Mock) infiziert. Wildtyp MVMP infizierte Zellen wurden unmittelbar nach der Infektion mit 0.1 % U/ml Neuraminidase behandelt, um eine Reinfektion durch Nachkommenviren zu verhindern. Eine Infektion mit wildtyp MVMP entsprechend des zuvor bestimmten Anteils in Präparationen der rekombinanten Viren, wurde ausserdem parallel durchgeführt. Drei Tage nach der Infektion wurde die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) (A) bzw. die Menge freigesetzter [³H]-AA (B) in den jeweiligen Kulturüberständen gemessen und, wie in der Legende zu Abb.3-1 beschrieben, quantifiziert.

erkennen, dass Zellen, die mit dem rekombinanten Virus NS-P4-GFP infiziert sind, keine Lyse zeigten. Mit einem Anteil von 9.1 % lysierter Zellen ist der durch dieses rekombinante Virus hervorgerufene Effekt mit dem in nicht infizierten Zellen vergleichbar (10.6 %). Zellen, die entsprechend der wildtyp MVMP Kontamination von 0.1% infiziert worden waren, waren zu 9.9 % lysiert. Auffallend war allerdings die lytische Aktivität der rekombinanten Viren, welche die VP1nt PLA₂ beinhaltende Sequenz exprimierten. Mit 31.3 % Lyse im Falle der NS-P4-VP1ntGFP Infektion bzw. 33.5 % Lyse für die Infektion mit NS-P4-mVP1ntGFP riefen diese Viren einen um ein mehrfaches erhöhten lytischen Effekt als NS-P4-GFP hervor, wenn auch einen geringeren lytischen Effekt als das wildtyp MVMP Virus (46.2 %). Erstaunlicherweise hatte die im katalytischen Motiv der parvoviralen PLA₂ eingebrachte Mutation, welche die virale PLA₂ Aktivität beeinträchtigen sollte, keinen Einfluss auf das lytische Verhalten des Virus.

Zur Überprüfung, ob die bei einer wildtyp MVMP Infektion beobachtete starke Freisetzung von AA auch auf einen Beitrag der VP1 N-terminalen Domäne zurückzuführen ist, wurden die rekombinanten Viren auch hinsichtlich dieses Effektes untersucht. Hierzu wurden [³H]-AA markierte Zellen, wie zuvor, mit wildtyp MVMP,

den rekombinanten MVMp Viren (MOI 10 RU/ml) oder nicht infiziert. Die Quantifizierung der drei Tage nach Infektion im Kulturüberstand nachgewiesenen [^3H]-AA ist in Abb. 3-8 B veranschaulicht. Während die Infektion mit NS-P4-GFP immerhin zu einer, verglichen mit nicht infizierten Zellen, leichten Freisetzung von AA (13.35 %) führt, beträgt die durch NS-P4-VP1ntGFP und NS-P4-mVP1ntGFP Infektion freigesetzte Menge an [^3H]-AA 25.7 % bzw. 24.4 % und ist somit fast so hoch, wie bei wildtyp MVMp infizierten Zellen (27.9 %). Auch in diesem Experiment hatte die Mutation der katalytischen PLA₂ Domäne keinen Einfluss auf den virusinduzierten Effekt. Das Ergebnis bestätigte aber dennoch den Zusammenhang von virusinduzierter AA-Freisetzung und Zelllyse.

Die Beobachtung des Defektes in der lytischen Aktivität des rekombinanten NS-P4-GFP Virus ließ schlussfolgern, dass das virale NS1 Protein allein für den lytischen Effekt des Virus nicht hinreichend ist. Bei Verwendung der rekombinanten Viren NS-P4-VP1ntGFP und NS-P4-mVP1ntGFP wurde weiterhin klar, dass die N-terminale Domäne des VP1 Proteins in diesem Zusammenhang von essentieller Bedeutung zu sein scheint, wenngleich eine Mutation des viralen PLA₂ Motivs diesen Effekt nicht behinderte.

An dieser Stelle ist zu bemerken, dass ein formaler Beweis über den tatsächlichen Verlust der enzymatischen PLA₂ Aktivität in VP1nt durch die Mutation des HD Motivs hier nicht erbracht wurde. Jedoch wurde in der vorliegenden Arbeit die Punktmutation H69G, gewählt, die, basierend auf dem Ergebnis von Sequenzvergleichen sowie darauf folgenden funktionellen Untersuchungen der VP1nt Domäne MVMp verwandter Parvoviren und VP1nt Mutanten durch Zadori *et. al.* (2001) eine Inaktivierung der katalytischen PLA₂ Aktivität garantieren sollte. Das HD Motiv, ist wie bereits zuvor angemerkt, gleichzeitig wichtiger Bestandteil der katalytischen Domäne zellulärer sPLA₂ (Dennis, 1997). Eine Mutation dieses Motivs wurde auch in der Untersuchung von sPLA₂ Funktionen zur Inaktivierung der hydrolytischen sPLA₂ Aktivität angewandt (Beck *et al.*, 2003b).

Aus den vorliegend beschriebenen Versuchen mit rekombinanten MVMp Viren konnte somit zusammenfassend gefolgert werden, dass die N-terminale, ein PLA₂ Motiv enthaltende, VP1 Domäne einen essentiellen Beitrag zur MVMp induzierten

Zellyse leistet, wahrscheinlich jedoch unabhängig von ihrer katalytischen PLA₂ Aktivität.

Ferner ließen die gezeigten Ergebnisse feststellen, dass die VP1 N-terminale Domäne eine relevante Funktion in der, einer MVMP induzierten Zellyse vorgeschalteten, AA-Freisetzung hat, welche aber durch die Mutation nicht beeinträchtigt wurde. Da die Regulation zellulärer PLA₂ bekannterweise in einem sehr komplexen Netzwerk organisiert ist, welches auch die gegenseitige Beeinflussung der verschiedenen PLA₂ Enzyme unabhängig von ihrer hydrolytischen Aktivität einbezieht (siehe Kapitel 1.4), wurde angenommen, dass die Funktion der viralen PLA₂ von rein regulatorischer Relevanz sein könnte. Es wurde somit vermutet, dass die massive, der Zellyse vorausgehende, AA-Freisetzung auf zelluläre PLA₂ Enzyme zurückzuführen ist. Die Analyse dieser Fragestellung wird im folgenden Kapitel beschrieben.

3.3 Untersuchungen zur Beteiligung zellulärer PLA₂ an der MVMP induzierten Zellyse

Basierend auf der Vermutung, dass die MVMP induzierte AA-Freisetzung auf einer Aktivität zellulärer PLA₂ beruhte, sollte eine prinzipielle Beteiligung dieser Enzyme analysiert werden.

Die Superfamilie der zellulären PLA₂ wird in die Gruppen der sekretorischen (sPLA₂), zytosolischen (cPLA₂) und Ca²⁺-unabhängigen (iPLA₂) PLA₂ unterteilt und zeichnet sich durch eine außerordentliche Vielfältigkeit aus. Jede der Enzymgruppen wird weiterhin in Subtypen unterschieden, die vor allem hinsichtlich ihrer Funktionsmechanismen und Regulation beträchtlich voneinander differieren können.

3.3.1 Einfluss selektiver Inhibitoren für zelluläre PLA₂ auf die MVMP-inudzierte Zellyse und AA-Freisetzung

Die hohe Diversität zellulärer PLA₂ Enzyme erschwert die genaue Erforschung ihrer spezifischen Funktionen in der Vielzahl zellulärer Prozesse, an denen sie beteiligt sind. Die Entwicklung von PLA₂ Inhibitoren hatte deshalb großen Einfluss auf die

Untersuchungen PLA₂ regulierter Vorgänge. Derzeitig gibt es PLA₂ Inhibitoren, die für sPLA₂, cPLA₂ oder iPLA₂ spezifisch sind. Geht man davon aus, dass zelluläre PLA₂ Enzyme in der MVMP induzierten Zelllyse von funktioneller Relevanz sind, wäre zu erwarten, dass durch den Einsatz von PLA₂ Inhibitoren dieser Prozess direkt beeinflussbar ist.

Im Folgenden sind die später im LDH-Assay und hinsichtlich der Freisetzung von AA nach MVMP Infektion getesteten Inhibitoren genauer beschrieben.

In dieser Arbeit wurden ausschließlich bereits erprobte PLA₂ Inhibitoren verwendet, die entweder kommerziell erhältlich waren (siehe 2.1.13.1) oder freundlicherweise durch M. Kaszkin (Universität Frankfurt), M. Gelb (Universität of Washington, USA) oder G. Lambeau (Universität Valbonne, Frankreich) zur Verfügung gestellt wurden. Die Inhibitoren, sowie ihr jeweiliges Target-Enzym sind in Tab. 3-1 zusammengefasst und werden nachfolgend kurz beschrieben.

Sowohl bei dem cPLA₂ Inhibitor AACOCF₃ (Arachidonyl-3-fluoro-methylketon) als auch MAFP (Methyl-arachidonyl-fluoro-phosphonat) handelt es sich um plasmamembrangängige Arachidonsäureanaloge (Street *et al.*, 1993; Lio *et al.*, 1996), welche das katalytische Zentrum der cPLA₂ Enzyme über die Bindung an ein Serin besetzen. Während die AACOCF₃ Bindung an cPLA₂ reversibel ist, ist die Bindung von MAFP irreversibel. Ein Nachteil beider Inhibitoren ist, dass sie in höherer Konzentration auch iPLA₂ inhibieren können, da auch das katalytische Zentrum dieser PLA₂ Gruppe über ein wichtiges Serin verfügt (Ackermann *et al.*, 1995; Lio *et al.*, 1996). Bromoenollacton (BEL) hingegen ist streng selektiv für die Vertreter der iPLA₂ Gruppe und ist deshalb eine ideale Substanz um in Kontrollexperimenten die Wirkung von AACOCF₃ oder MAFP zu überprüfen (Ackermann *et al.*, 1995; Balsinde und Dennis, 1996; Balsinde *et al.*, 1999).

Pyrrolidine-1 ist ein Inhibitor, der reversibel an cPLA₂ bindet und schon in sehr geringen Konzentrationen außerordentlich effektiv cPLA₂ selektiv inhibiert (Seno *et al.*, 2000; Ghomashchi *et al.*, 2001).

Tab. 3-1: Zusammenstellung der in dieser Arbeit verwendeten Inhibitoren für zelluläre PLA₂.

Inhibitor	vollständiger Name	Target	Referenz
AACOCF3	Arachidonyl-3-fluoro-methyl-keton	cPLA ₂ (iPLA ₂)	Street <i>et al.</i> , 1993 Ackermann <i>et al.</i> , 1995
MAFP	Methyl-arachidonyl-fluoro phosphonat	cPLA ₂ (iPLA ₂)	Lio <i>et al.</i> , 1996
BEL	Bromoenollacton	iPLA ₂	Ackermann <i>et al.</i> , 1995 Balsinde <i>et al.</i> , 1995, 1996
Pyrrolidine-I		cPLA ₂	Seno <i>et al.</i> , 2000 Ghomashchi <i>et al.</i> , 2001
Me- Indoxam		sPLA ₂	Hagishita <i>et al.</i> , 1996 Smart <i>et al.</i> , 2004
LY311727	-3-(3-Acetamid-1-benzyl-2-ethylindolyl-sulfon-5-oxy) propansäure	sPLA ₂	Schevitz <i>et al.</i> , 1995
12-epi scalaradial		sPLA ₂	Potts <i>et al.</i> , 1992 Ghomashi <i>et al.</i> , 1998 Thommesen <i>et al.</i> , 1998 Baek <i>et al.</i> , 2000

Als wasserlösliche Enzyme müssen zelluläre sekretorische PLA₂ (sPLA₂) zunächst an die Membran assoziieren, um auf ihr Substrat zugreifen zu können (Gelb *et al.*, 1995). In der Vergangenheit beruhte die Wirkungsweise vieler Inhibitoren auf einer Unterbindung dieser Interaktion und nicht auf der spezifischen Inhibition der enzymatischen Aktivität. Heute ist eine Vielzahl chemischer Wirkstoffe zur kompetitiven Inhibition der katalytischen Domäne des Enzyms in der Erprobung. Hinsichtlich einer Anwendung in Säugerzellen haben sich die sogenannten Indolanaloge als sehr wirkungsvoll erwiesen (Hagishita *et al.*, 1996; Singer *et al.*, 2002; Smart *et al.*, 2004). In der vorliegenden Arbeit wurden zur Inhibition der sPLA₂ aus dieser Gruppe Substanzen, wie LY311727 (-3-(3-Acetamid-1-benzyl-2-ethylindolyl-sulfon-5-oxy) Propansäure) (Schevitz *et al.*, 1995) und Me-Indoxam, aus verwendet. Sowohl LY311727 als auch Me-Indoxam sind sehr spezifische sPLA₂ Inhibitoren. Von erheblicher Relevanz ist, dass beide Substanzen nicht plasmamembrangängig sind (persönliche Kommunikation M. Gelb / G. Lambeau und (Mounier *et al.*, 2004)). Sie inhibieren demnach ausschließlich sezernierte, also

extrazellulär lokalisierte, sPLA₂ Enzyme. 12-epi scalaradial ist das Derivat eines Produktes mariner *Porifera*, wurde in den neunziger Jahren als irreversibler Inhibitor der sPLA₂ beschrieben (Potts *et al.*, 1992) und daraufhin in einer Vielzahl von Studien als solcher verwendet (Ghomashchi *et al.*, 1998; Thommesen *et al.*, 1998; Baek *et al.*, 2000). Von Vorteil ist, dass es sich hierbei um einen plasmamembrangängigen Wirkstoff handelt.

Folgende Faktoren mussten bei der Planung der Experimente ebenfalls berücksichtigt werden.

Einige Inhibitoren haben unter Zellkulturbedingungen eine sehr geringe Stabilität von wenigen Stunden. Zum Teil handelt es sich um kompetitive Inhibitoren, deren Effekt somit als reversibel zu betrachten ist. Erschwerend war, dass sich der lytische Prozess nach MVMp Infektion erst nach drei Tagen einstellt. Es war somit unabdingbar herauszufinden, zu welcher Zeit nach Infektion die Zugabe der potentiellen Inhibitoren einen größtmöglichen Effekt zeigen würde. Nach Auswertung mehrerer Experimente, die hier nicht im Detail beschrieben werden sollen, konnte etabliert werden, dass der optimale Zeitpunkt der Inhibitorzugabe bei 24 h nach Infektion lag. Die Untersuchung eines Effektes der Inhibitoren auf nicht infizierte Zellen ergab, dass ausschließlich 12-epi scalaradial in Konzentrationen >5µM einen toxischen Effekt auf diese hatte (siehe auch Abb. 3-9 C, Mock).

Zur Analyse des Effektes der Inhibitoren auf die virusinduzierte Zelllyse wurden A9 Zellen zunächst mit MVMp bei einer MOI von 5 RU / Zelle oder nicht infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Zellen mit unterschiedlichen Konzentrationen der PLA₂ Inhibitoren versetzt. Um zu verhindern, dass ein Mediumwechsel unerwünschte Nebeneffekte hervorrufen würde, erfolgte die Zugabe der Inhibitoren zum Kulturmedium in höherkonzentrierten Verdünnungen bis zur gewünschten Endkonzentration. Drei Tage nach Infektion wurden die Kulturen hinsichtlich des Anteils lysierter Zellen mithilfe des LDH-Assays quantifiziert.

In Abb. 3-9 A bis C sind die Ergebnisse mehrerer unabhängiger LDH-Assays, unter Verwendung der verschiedenen PLA₂ Inhibitoren, graphisch zusammengefasst.

Die in Abb. 3-9 A dargestellten Diagramme dokumentieren den Einfluss der cPLA₂ Inhibitoren AACOCF₃, MAFP und Pyrrolidine-1. Schon auf den ersten Blick war ein deutlicher inhibitorischer Einfluss aller drei verwendeten Substanzen auf die MVMp

induzierte Zelllyse zu erkennen. Der inhibitorische Effekt war unter Verwendung von AACOCF₃ am deutlichsten (Verringerung der MVMp induzierten Zelllyse um 74.2 % bei 10 μ M), gefolgt von Pyrrolidine-1 (53 % bei 1 μ M) und MAFP (37.1 % bei 10 μ M) (zusammengefasst in Abb. 3-9 D) und stellte sich als konzentrationsabhängig heraus. Wie zuvor erwähnt, können sowohl AACOCF₃ als auch MAFP in bestimmten Konzentrationen auch als iPLA₂ Inhibitoren in Erwägung gezogen werden. Mithilfe des für iPLA₂ selektiven Inhibitors BEL konnte dieser Aspekt überprüft werden. Wie in Abb. 3-9 B deutlich wird, hatte BEL keinen signifikanten Einfluss (8.2 % bei 10 μ M) auf den Anteil durch MVMp lysierte Zellen. Es konnte somit ausgeschlossen werden, dass der mit AACOCF₃ und MAFP beobachtete Effekt auf einer Inhibition zellulärer iPLA₂ beruhte.

Die in Abb. 3-9 C gezeigten Diagramme veranschaulichen den Einfluss der sPLA₂ Inhibitoren Me-Indoxam, LY311727 und 12-epi scalaradial. Während weder Me-Indoxam noch LY311727 einen signifikant inhibitorischen Effekt auf die Zelllyse ausübten, konnte durch 12-epi scalaradial eine Verringerung des Anteils lysierter Zellen um 62.2 % (bei 1 μ M) festgestellt werden. Dieses Ergebnis sollte dennoch kritisch betrachtet werden. Wie sich später herausstellte, beruht die Wirkung von 12-epi scalaradial auf die eher unspezifische Ausbildung von *Schiffschen* Basen mit Lysinresten auf der Enzymoberfläche (persönliche Kommunikation M. Gelb/ G. Lambeau). Seine Spezifität für sPLA₂ ist somit zweifelhaft.

Es kann zusammengefasst werden, dass durch die hier verwendeten cPLA₂ Inhibitoren, die MVMp induzierte Zelllyse, zwar nicht vollständig verhindert, aber ganz erheblich beeinträchtigt werden konnte. Es soll hier bemerkt werden, dass in weiteren eigenen Studien, unabhängig von den vorliegend gezeigten Ergebnissen, bei einer Verwendung des Pyrrolidine-1 verwandten cPLA₂ Inhibitors Pyrrolidine-2 (Ono *et al.*, 2002) sogar ein inhibitorischer Effekt von bis zu 97% auf die MVMp induzierte Zelllyse erreicht werden konnte. Während die extrazellulär aktiven spezifischen sPLA₂ Inhibitoren Me-Indoxam und LY311727 keinen Effekt zeigten, reduzierte der Einsatz von 12-epi scalaradial, die Zelllyse beachtlich. Die Beteiligung zellulärer sPLA₂ an der MVMp induzierten Zelllyse konnte allerdings auf Grundlage der hier erzielten Ergebnisse nicht eindeutig nachgewiesen, formal aber auch nicht ausgeschlossen werden. Da BEL, welches zelluläre iPLA₂ selektiv inhibiert, keinen

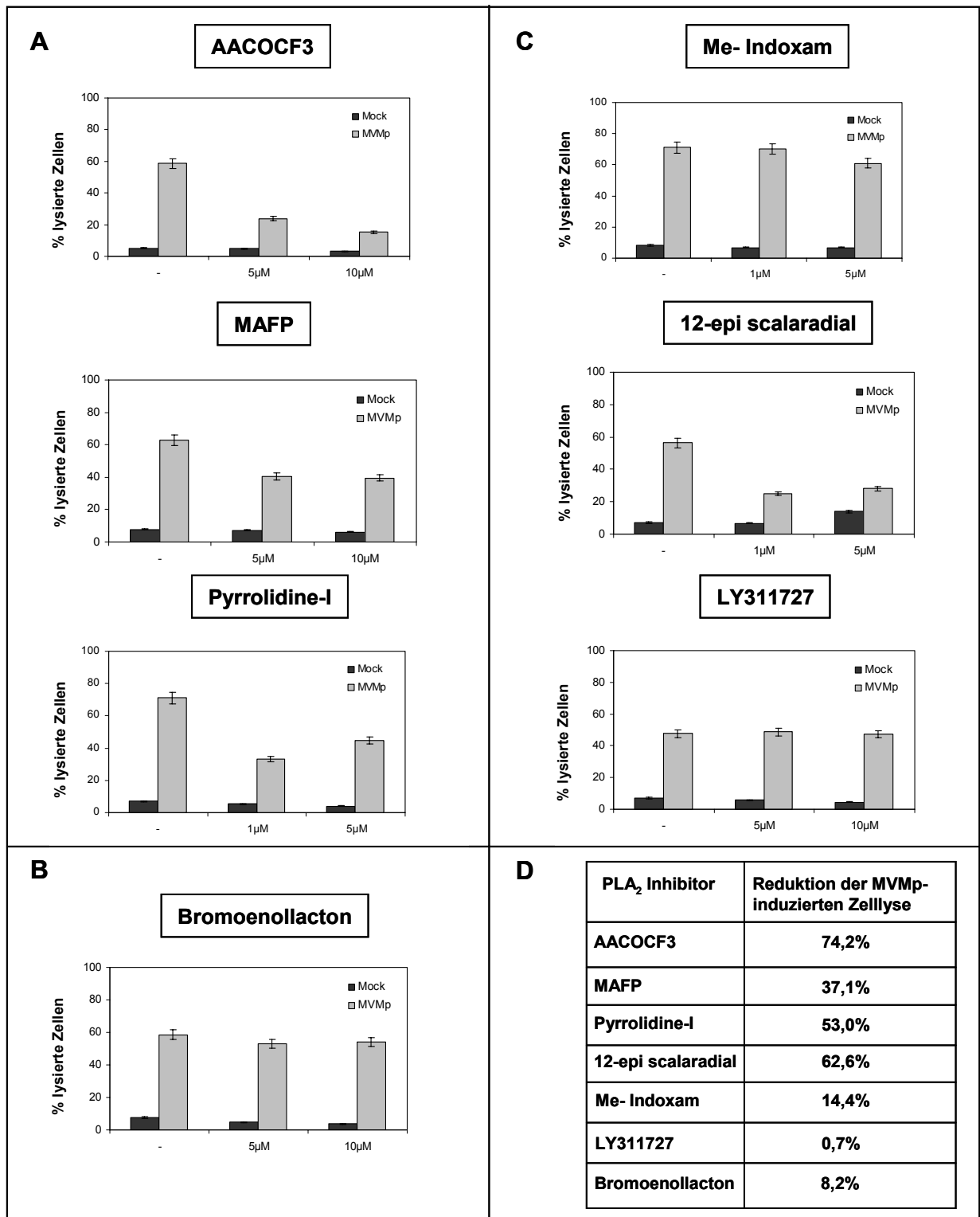


Abb. 3-9: Einfluß von PLA₂ Inhibitoren auf die MVMp induzierte Zelllyse.

A9 Zellen wurden mit MVMp bei einer MOI von 5 RU / Zelle oder nicht (Mock) infiziert. 24 h nach Infektion wurden die Zellen mit den jeweiligen PLA₂ Inhibitoren in der angegebenen Endkonzentration versetzt. Drei Tage nach der Infektion wurde die Freisetzung von Lactatdehydrogenase (LDH) in den jeweiligen Kulturüberständen gemessen und der Anteil lysierter Zellen prozentual, wie in der Legende zu Abb. 3-1 beschrieben, bestimmt. Graphisch dargestellt sind der Einfluss der cPLA₂ Inhibitoren AACOCF3, MAFP und Pyrrolidine-1 (**A**), des iPLA₂ Inhibitors Bromoenollacton (**B**) sowie der sPLA₂ Inhibitoren Me- Indoxam, LY311727 und 12-epi scalaradial (**C**). Die Verringerung der MVMp induzierten Zelllyse ist in (**D**) prozentual für AACOCF3 bei 10 µM, MAFP bei 10 µM, für Pyrrolidine-1 bei 1 µM, für 12-epi scalaradial bei 1 µM, für Me-Indoxam bei 5 µM, für LY311727 bei 10 µM sowie für Bromoenollacton bei 10 µM zusammengefasst. Die in den Graphiken aufgezeigten Werte stellen unter Berücksichtigung der angegebenen Standardabweichung Mittelwerte aus mehreren unabhängigen Experimenten dar.

Effekt auf MVMp infizierte Zellen hatte, spielt iPLA₂ vermutlich keine zentrale Rolle in der MVMp vermittelten Zelllyse.

Diese Ergebnisse deuteten darauf hin, dass zelluläre PLA₂, genauer gesagt cPLA₂ und eventuell sPLA₂, tatsächlich wesentlich am Prozess der MVMp induzierten Zelllyse beteiligt sind. Im Weiteren sollte deshalb untersucht werden, ob diese zellulären PLA₂ die massive AA-Freisetzung nach MVMp Infektion bewirken.

Zu diesem Zweck wurden die PLA₂ Inhibitoren, welche einen Effekt auf die MVMp induzierte Zelllyse zeigten, auch hinsichtlich ihres Einflusses auf die MVMp induzierte Freisetzung von [³H]-AA untersucht.

[³H]-AA markierte Zellen wurden mit MVMp (MOI von 5 RU / Zelle) infiziert und 24 h nach Infektion, wie zuvor für die Untersuchung der Zelllyse beschrieben, mit den Inhibitoren AACOCF₃, MAFP, Pyrrolidine-1 oder 12-epi scalaradial behandelt. Drei Tage nach Infektion wurde die Menge freigesetzter [³H]-AA in den Kulturüberständen bestimmt. Abb. 3-10 fasst graphisch die Resultate mehrerer unabhängiger Experimente zusammen. Wie in Abb. 3-10 C gezeigt, betrug der in nicht infizierten Zellkulturen freigesetzte Anteil an [³H]-AA 8.8 % der insgesamt inkorporierten [³H]-AA Menge. Dieser Anteil änderte sich nach Behandlung der Zellen mit den jeweiligen PLA₂ Inhibitoren in den verwendeten Konzentrationen kaum und entsprach somit dem Hintergrund. Zur Verdeutlichung des Einflusses der Inhibitoren auf die Freisetzung von [³H]-AA nach MVMp Infektion, wurde der entsprechende Hintergrundanteil von allen Werten subtrahiert.

Abb. 3-10 A zeigt die Ergebnisse unter Einfluss der cPLA₂ Inhibitoren AACOCF₃, MAFP und Pyrrolidine-1 und Abb. 3-10 B illustriert das Ergebnis bei Verwendung des sPLA₂ Inhibitors 12-epi scalaradial. Die Ergebnisse zeigten, dass alle auf die MVMp induzierte Zelllyse inhibitorisch wirkenden Substanzen auch inhibitorisch auf die [³H]-AA Freisetzung wirkten. Der maximal erreichte inhibitorische Effekt eines jeden Inhibitors ist in Abb. 3-10 D tabellarisch aufgeführt und beträgt für AACOCF₃ 72.4 % (bei 5 µM), für MAFP 37.8 % (bei 5 µM), für Pyrrolidine-1 53.4 % (bei 1 µM) sowie für 12-epi scalaradial 70.2 % (bei 5 µM).

Zusammengefasst unterstützen diese Daten die Vermutung, dass die Aktivität zellulärer PLA₂ in der durch MVMp ausgelösten Phospholipidhydrolyse und der damit

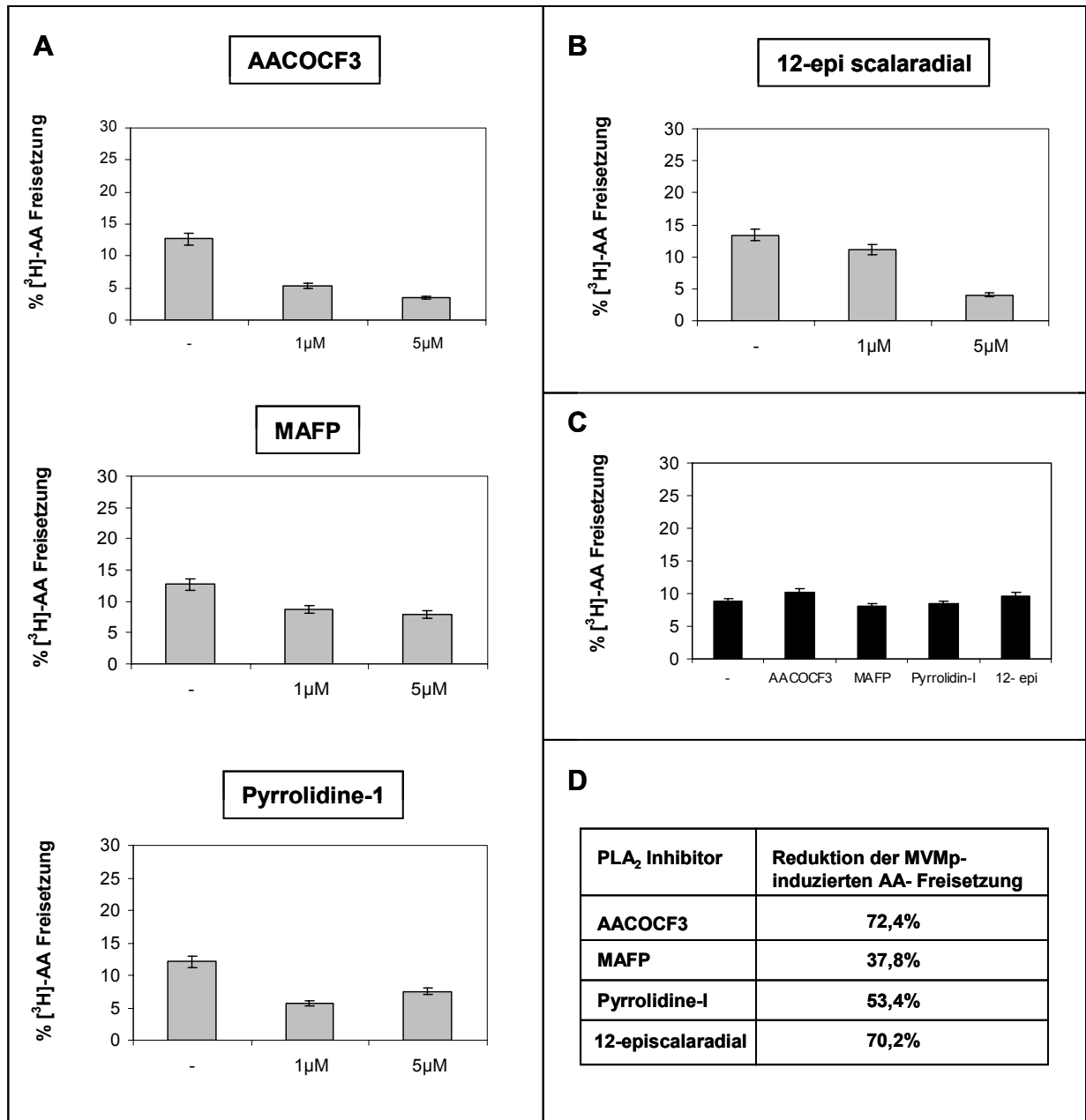


Abb. 3-10: Einfluß von PLA₂ Inhibitoren auf die MVMP induzierte [³H]-AA Freisetzung.

A9 Zellen wurden einen Tag vor der Infektion mit [³H]-AA markiert (siehe 2.2.1.9.), mit MVMP bei einer MOI von 5 RU / Zelle oder nicht (Mock) infiziert und 24 h nach Infektion mit den jeweiligen PLA₂ Inhibitoren in der angegebenen Endkonzentration versetzt. Drei Tage nach der Infektion wurde die Menge freigesetzter [³H]-AA in den jeweiligen Kulturüberständen gemessen und prozentual im Verhältnis zur insgesamt inkorporierten [³H]-AA Menge (inklusive Kulturüberstand) errechnet. Graphisch dargestellt sind der Effekt der cPLA₂ Inhibitoren AACOCF3, MAFP und Pyrrolidine-1 (**A**), des sPLA₂ Inhibitors 12-epi scalaradial (**B**) sowie der Effekt der Inhibitoren auf nicht infizierte Zellen (**C**). Die Verringerung der MVMP induzierten [³H]-AA Freisetzung ist in (**D**) prozentual für AACOCF3 bei 5 µM, MAFP bei 5 µM, für Pyrrolidine-1 bei 1 µM sowie für 12-epi scalaradial bei 5 µM zusammengefasst. Die in den Graphen aufgezeigten Werte stellen unter Berücksichtigung der angegebenen Standardabweichung Mittelwerte mehrerer unabhängiger Experimente dar.

verbundenen AA-Freisetzung eine essentielle Rolle spielen können. Zusätzlich bekräftigten sie die Hypothese, dass es sich bei dieser PLA₂ Aktivität und der MVMP verursachten Zelllyse um eng zusammenhängende Prozesse handelt. Dies wird

auch bei einem Vergleich der jeweils tabellarisch zusammengefassten inhibitorischen Effektivität deutlich, da die prozentualen Werte hinsichtlich der Inhibition MVMp induzierter Zelllyse und diejenigen der Inhibition MVMp induzierter Freisetzung von [^3H]-AA für die jeweilig verwendete Substanz annähernd gleich waren.

3.3.2 Einfluss der Inhibitoren zellulärer PLA₂ auf frühe Stadien des viralen Infektionszyklus

Um sicherzustellen, dass es sich bei der beobachteten Inhibition der MVMp induzierten Zelllyse um einen auf dieses späte Stadium des Infektionszyklus begrenzten Effekt handelte, galt es den Einfluss der zuvor getesteten Substanzen auf weitere Stadien des viralen Zyklus zu analysieren. So sollte untersucht werden, ob die Verminderung der MVMp vermittelten Phospholipidhydrolyse und der Zelllyse Folgeerscheinungen der Hemmung anderer wichtiger Stadien, wie dem Viruseintritt in die Zelle, der Expression oder der Replikation waren.

3.3.2.1 Einfluss der Inhibitoren zellulärer PLA₂ auf den Viruseintritt

Die Untersuchung eines möglichen Einflusses der PLA₂ Inhibitoren auf den Eintritt des Virus in die Zelle war von besonderem Interesse, da man davon ausgeht, dass die im VP1 Kapsidprotein des Virus vorhandene parvovirale PLA₂ Aktivität die Überführung der viralen DNA vom späten Endosom in den Zellkern entschieden beeinflusst. Für den Fall, dass die Inhibitoren einen negativen Effekt auf die parvovirale PLA₂ ausüben würden, wäre zu erwarten, dass in einem Großteil der mit PLA₂ Inhibitor behandelten Zellen die Viruskapside im Zytoplasma verbleiben und somit auch keine Expression des viralen NS1 Proteins erfolgt.

Zur Analyse dieser Fragestellung wurden Zellen bereits für 2 h vor der MVMp Infektion, sowie für den gesamten Zeitraum von 12 h nach der Infektion mit den PLA₂ Inhibitoren AACOCF₃, MAFP, Pyrrolidine-1 und 12-epi scalarial inkubiert. 12 h nach Infektion wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenzfärbung des viralen NS1 Proteins und der Viruskapsidproteine VP1/VP2 verwendet. Die DNA wurde zur Darstellung des Zellkerns mit Dapi, die NS1 und Kapsidproteine VP1/VP2 mit spezifischen Antisera angefärbt. Die immunfluoreszenzgefärbten Zellen wurden mikroskopisch analysiert und die Anzahl der Zellen bestimmt, in denen

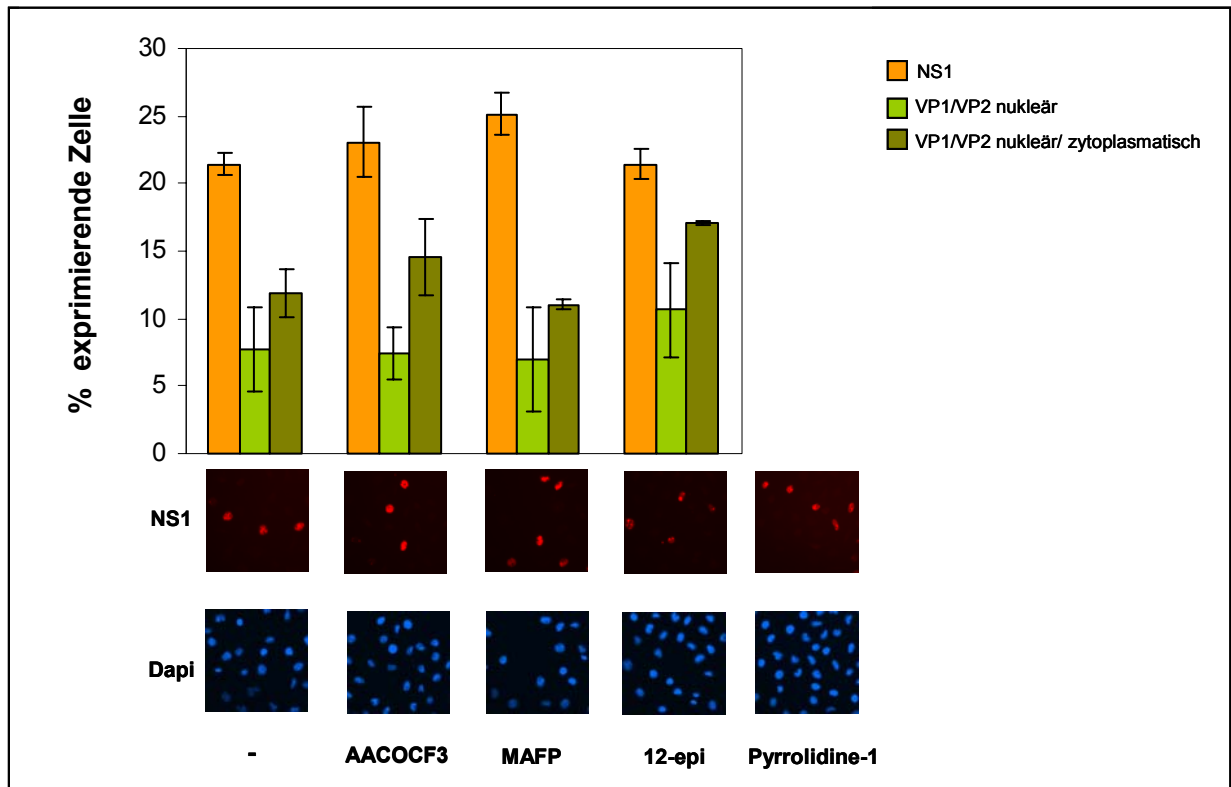


Abb. 3-11: Einfluß von PLA₂ Inhibitoren auf den MVMp Eintritt in die Zelle und den Kerntransport.

A9 Zellen wurden auf *spot slides* ausgesät und anschließend für 2 h vor der Infektion, während der Infektion und für weitere 12 h nach der Infektion mit MVMp (MOI 5 RU / Zelle) mit den angegebenen PLA₂ Inhibitoren behandelt. Danach wurden die Zellen fixiert und für die Immunfluoreszenzfärbung (siehe 2.2.5.7.2) verwendet. Zelluläre DNA wurde zur Zellkerndarstellung mit Dapi angefärbt. Die NS1 Detektion erfolgte mit dem NS1-spezifischen murinen 3D9 Primärantikörper und einem Cy3-konjugierten Sekundärantikörper. Die Detektion der Kapsidproteine VP1/VP2 erfolgte mit dem Kapsidprotein-spezifischen TATT3 Primärantikörper und einem AlexaFluor488®-konjugierten Sekundärantikörper (siehe 2.1.8). Die Dokumentation erfolgte mit einem Fluoreszenzmikroskop bei 40facher Vergrößerung. Die Anregung der Dapi-Färbung erfolgte bei 358 nm, die Anregung der Cy3-Färbung erfolgte bei 550 nm und die der Alexa-Färbung bei 488 nm. Der obere Teil der Abbildung illustriert graphisch die prozentuale Menge NS1- positiver Zellen (■), sowie den prozentualen Anteil an Zellen mit rein nukleär lokalisierten Kapsidproteinen (■) und den Anteil an Zellen mit sowohl nukleär als auch zytoplasmatisch lokalisierten Kapsidproteinen (■). Die in der Graphik dargestellten Werte stellen, unter Berücksichtigung der jeweiligen angegebenen Standardabweichung, Mittelwerte der Auszählung durch zwei unabhängige Personen an je drei zufällig ausgewählten Regionen aus der jeweiligen Zellpopulation dar. Der untere Teil der Abbildung verdeutlicht photographisch bei 40facher Vergrößerung den Anteil NS1-positiver Zellen nicht behandelter und mit Inhibitoren behandelter Versuchsansätze.

Kapsidproteine bzw. NS1 nachgewiesen werden konnte. Hierbei wurden Zellen mit rein nukleär lokalisierten Kapsidproteinen unabhängig von Zellen mit sowohl nukleärer als auch zytoplasmatischer Lokalisation der Kapsidproteine erfasst. Die Quantifizierung dieser Auszählung ist in Abb. 3-11 sowohl im Diagramm als auch, für NS1, photographisch veranschaulicht. 12 h nach Infektion mit MVMp bei einer MOI von 5 RU / Zelle konnten ca. 22 % NS1- positive Zellen, ca. 7.5 % Zellen mit nukleär lokalisierten Kapsidproteinen sowie ca. 12 % Zellen mit sowohl nukleär als auch

zytoplasmatisch lokalisierten Kapsidproteinen detektiert werden. Die Ergebnisse nach der Behandlung der Zellen mit den angegebenen Substanzen AACOCF₃, MAFP, Pyrrolidine-1 sowie 12-epi scalaradial unterlagen leichten Schwankungen. Im Mittel konnte jedoch kein hemmender Effekt der Inhibitoren, weder für zelluläre cPLA₂ noch für sPLA₂, auf den Eintritt des Virus in die Zelle, die Translokation in den Zellkern sowie die initialen Schritte der viralen Replikation und NS1-Expression nachgewiesen werden.

Da die parvovirale PLA₂ als sPLA₂ klassifiziert wurde, war dieses Ergebnis insofern erstaunlich, als dass zumindest für die Behandlung mit dem sPLA₂ Inhibitor 12-epi scalaradial ein Effekt auf den Kerntransport des Virus zu erwarten gewesen wäre. Allerdings konnte somit ausgeschlossen werden, dass die beobachtete und in Abb. 3-9 veranschaulichte Inhibition der Zelllyse durch die PLA₂ hemmenden Substanzen auf einer initialen Hemmung der frühen Stadien des Infektionszyklus beruhte.

3.3.2.2 Einfluss der Inhibitoren zellulärer PLA₂ auf die virale Replikation und Expression

Die Untersuchung eines Effektes der PLA₂ Inhibitoren auf die späteren Stadien der viralen Replikation und auf die Expression der viralen Proteine erfolgte im Southern und Western Blot.

Die Zellen wurden dazu unmittelbar nach MVMp Infektion mit den Inhibitoren versetzt und 36 h später geerntet. Anschließend wurden aus diesen Zellen zum einen die virale DNA nach der modifizierten *Hirt*-Methode (2.2.4.8) extrahiert und zum anderen Gesamtproteinextrakte hergestellt. 2.5 µg DNA wurden im Agarosegel aufgetrennt und im Southern Blot auf die viralen Replikationsintermediate dRF (dimere replikative Form), mRF (monomere replikative Form) und ss DNA (einzelssträngige Virion-DNA) untersucht. Zum Nachweis der viralen NS und VP Proteine wurden 25 µg Gesamtzellproteinextrakt im Western Blot analysiert. Wie aus Abb. 3-12 A klar wird, war das Verhältnis zwischen mRF, dRF und ss DNA in Anwesenheit der PLA₂ Inhibitoren unverändert im Vergleich zur Kontrollinfektion ohne Inhibitoren. Auch die Menge der exprimierten NS1, NS2, sowie VP1 und VP2 Proteine (Abb. 3-12 B) war im Vergleich zu infizierten, nicht behandelten Zellen unbeeinträchtigt.

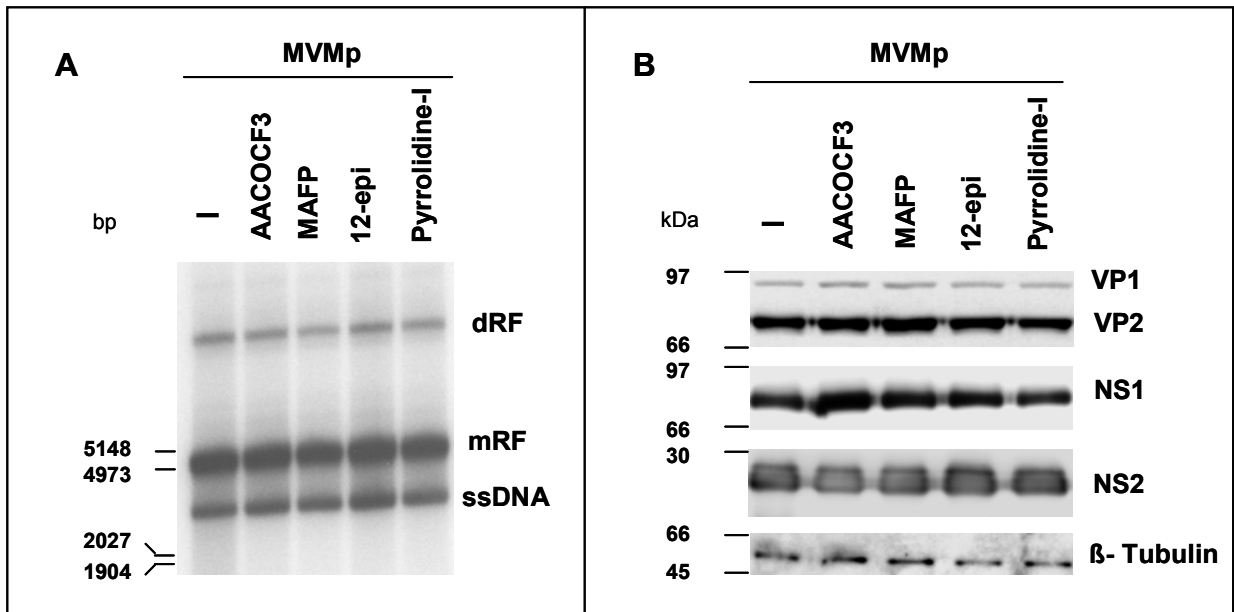


Abb. 3-12: Einfluß von PLA₂ Inhibitoren auf die MVMp Replikation und Expression.

2 h nach der Infektion von A9 Zellen mit MVMp bei einer MOI von 5 RU / Zelle wurden die Zellen mit den PLA₂ Inhibitoren AACOCF3 (10 μ M), MAFP (10 μ M), Pyrrolidine-1 (5 μ M) oder 12-epi scalarial (5 μ M) versetzt und für weitere 36 h kultiviert. Anschließend wurden die Zellen extrahiert um sie hinsichtlich der viralen Replikation mithilfe des Southern Blots (2.2.4.9) und hinsichtlich der Expression viraler Proteine mithilfe des Western Blots (2.2.5.7.1) zu analysieren. **(A)** Zur Untersuchung der viralen Replikation wurden 2.5 μ g *Hirt*-extrahierte, homogenisierte DNA verwendet. Die Detektion der viralen Replikationsintermediate erfolgte mit einer [³²P]-markierten NS-spezifischen DNA-Sonde. Als Molekulargewichtsstandard diente *Hind*III/*Eco*RI verdaut λ DNA. dRF: dimere Replikationsform, mRF: monomere Replikationsform, ss DNA: Virion-DNA **(B)** Zur Analyse der Expression der viralen Proteine NS1, NS2, VP1 und VP2 wurden 50 μ g Gesamtzellproteinextrakt in einer 10%igen SDS PAGE aufgetrennt. Für die Detektion der Proteine im Western Blot wurden der Kapsidprotein-spezifische TATT3 Antikörper, der NS1-spezifische SP8 Antikörper sowie der NS2-spezifische SP6 Antikörper angewendet (siehe 2.1.8). Zelluläres β -Tubulin wurde als Kontrolle mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Als Molekulargewichtsstandard diente der RainbowTM Marker (Amersham).

Die Experimente zeigten somit, dass die PLA₂ Inhibitoren weder auf die virale Replikation noch die Transkription und Translation der viralen Proteine einen Einfluss hatten.

Daher gefolgert werden, dass es sich bei der Hemmung der MVMp induzierten Zelllyse durch die verwendeten Inhibitoren zellulärer PLA₂, um einen spezifischen Effekt handelte, der nicht als Folgeerscheinung einer Beeinträchtigung vorhergehender Stadien des viralen Lebenszyklus zu betrachten war.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass, die Inhibition zellulärer cPLA₂ und möglicherweise auch sPLA₂ einen direkten Einfluss auf die virusinduzierte AA-Freisetzung und Zelllyse hatte. Somit lag die Vermutung nahe, dass die genannten PLA₂ einen wichtigen Beitrag in diesen MVMp vermittelten Effekten leisteten. Um eine Funktion zellulärer PLA₂ in der MVMp induzierten Lyse detailliert zu klären, war

es weiterhin von Interesse, auch eine eventuelle Aktivierung von cPLA₂ und sPLA₂ in infizierten Zellen zu untersuchen.

3.4 Untersuchungen zur MVMp induzierten Aktivierung zellulärer PLA₂

Sowohl die Regulation der Aktivierung als auch die verschiedenen Funktionsmechanismen zellulärer cPLA₂ und sPLA₂ sind sehr komplex. Für die Aufklärung einer möglichen Beteiligung dieser Enzyme an der MVMp vermittelten Zellyse sollte analysiert werden, ob verschiedene charakteristische Merkmale der Aktivierung von cPLA₂ und sPLA₂ in der infizierten Zelle auftraten. Im folgenden Kapitel (3.4.1) soll zunächst auf die Analyse einer Aktivierung zellulärer cPLA₂, im darauf folgenden Kapitel (3.4.2) auf die Analyse der sPLA₂ eingegangen werden.

3.4.1 Zelluläre cPLA₂

Zelluläre cPLA₂ liegt in inaktiver Form löslich im Zytoplasma der Zelle vor. Infolge der Aktivierung einer Zelle kommt es zur Stimulation von Faktoren, die eine Aktivierung

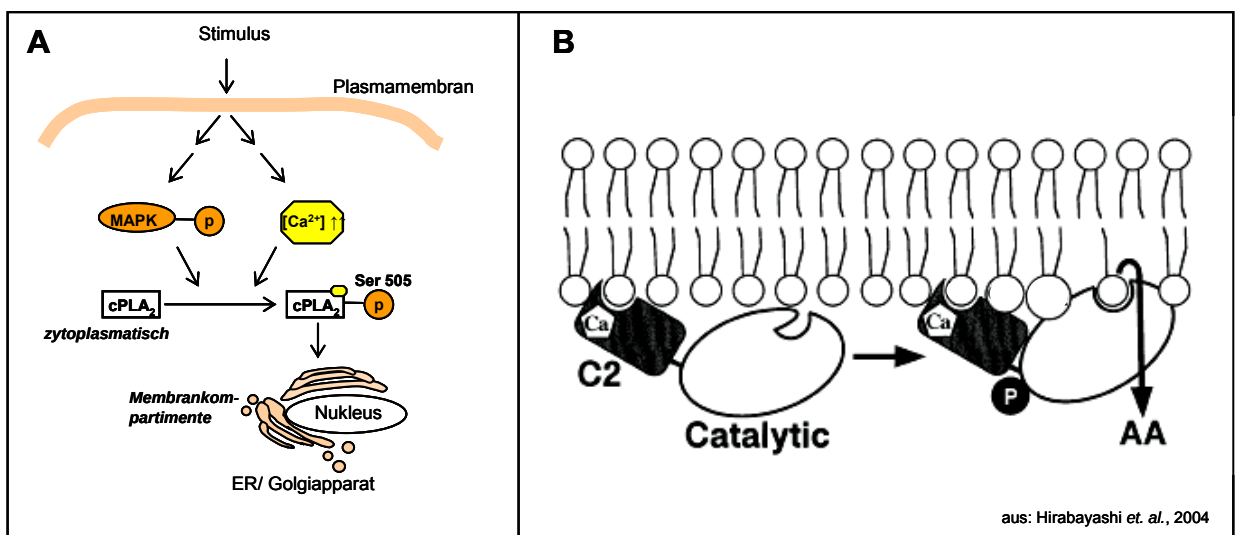


Abb.3-13: Schematische Darstellung der cPLA₂ Aktivierung.

(A) Stimulus-aktivierte MAPK führen zu einer Phosphorylierung von cPLA₂ an definierten Serinresten, insbesondere Serin 505. Durch die Bindung von Ca²⁺ transloziert cPLA₂ zu perinukleären Membrankompartimenten. (B) An der Membran wird durch das an die N-terminale C2 Domäne gebundene Ca²⁺ die Assoziation des Enzyms mit der Zielfmembran stabilisiert. Die Phosphorylierung von cPLA₂ verursacht konformationelle Veränderungen, infolge welcher, das Substrat für die katalytische Domäne zugänglich wird. Es kommt zur Phospholipidhydrolyse und AA-Freisetzung.

der cPLA₂ hervorrufen können (vergleiche Abb. 3-13 A). Für die Aktivierung von cPLA₂ ist neben anderen Proteinkinasen insbesondere die Stimulation von Kinasen der MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) Familie von großer Bedeutung. p38 und p44/42 MAPK phosphorylieren cPLA₂ an verschiedenen Serinresten, wobei für eine maximale katalytische Aktivität des Enzyms vor allem eine Phosphorylierung an Serinrest 505 (Ser505) erfolgen muss. Ein weiteres wichtiges Ereignis in der Aktivierung von cPLA₂ ist die Ca²⁺ vermittelte Translokation des Enzyms vom zytosolischen Raum zu Membrankompartimenten der Zelle. Hierzu bindet Ca²⁺ an eine Bindungsstelle im N-Terminus des Proteins und stabilisiert damit die Assoziation des Enzyms mit der Zielfmembran (Abb. 3-13 B). Durch cPLA₂ attackierte Membrankompartimente befinden sich zumeist in der perinukleären Region. An diesen Membranen findet es nicht nur das zu hydrolysierende Substrat, sondern befindet sich hier außerdem in direkter Nachbarschaft zu nachgeordneten Enzymen. Diese, beispielsweise Cyclooxygenasen (COX), verwenden die durch cPLA₂ freigesetzte AA unmittelbar zur Produktion von Lipidmediatoren, wie Prostaglandinen.

Die zwei großen Hauptmerkmale einer cPLA₂ Aktivierung sind somit die MAPK vermittelte Phosphorylierung an Serinrest 505 und die Translokation des Enzyms vom Zytosol zu perinukleären Membrankompartimenten der Zelle.

3.4.1.1 Phosphorylierung und Translokation von cPLA₂ infolge der MVMp Infektion

Um eine mögliche Aktivierung zellulärer cPLA₂ nach der MVMp Infektion aufzuklären, sollten infizierte Zellen hinsichtlich der zuvor beschriebenen Hauptmerkmale einer cPLA₂ Aktivierung analysiert werden.

Zur Untersuchung einer cPLA₂ Phosphorylierung an Ser505 wurde ein für diese Phosphorylierungsstelle spezifisches Antiserum verwendet. Mit diesem konnte phosphoryliertes cPLA₂ in Gesamtzellextrakten nach der MVMp Infektion nachgewiesen werden. Zellen, infiziert mit MVMp (MOI 5 RU / Zelle), wurden hierzu 24, 48 oder 72 h nach Infektion zur Proteinextraktion geerntet. Der Proteinnachweis erfolgte im Western Blot.

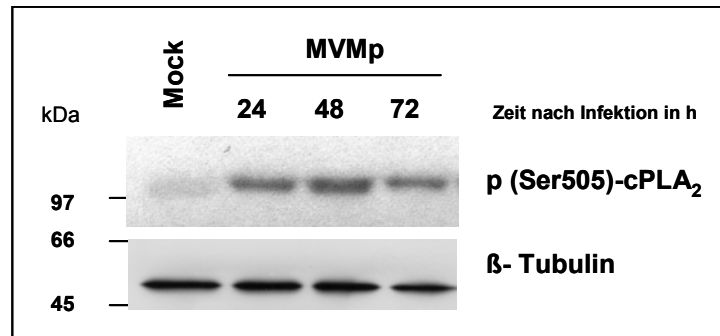


Abb. 3-14: cPLA₂ Phosphorylierung nach der MVMp Infektion.

A9 Zellen wurden mit MVMp (MOI 5 RU / Zelle) infiziert. 24, 48 und 72 h nach der Infektion wurden die Zellen zur Proteinextraktion geerntet. Nicht infizierte Zellen (Mock) wurden 72 h nach Infektion extrahiert. 50 µg Protein wurden in einer 10%igen SDS PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die Detektion von an Serinrest 505 phosphorylierter cPLA₂ (p(Ser505)-cPLA₂) erfolgte über ein für diese Phosphorylierung spezifisches Antiserum. β-Tubulin wurde mit einem spezifischen monoklonalen Antiserum nachgewiesen (siehe 2.1.8)

Abb. 3-14 zeigt den in den infizierten Zellen vorhandenen Anteil Serin505-phosphorylierter cPLA₂ 24 h, 48 h bzw. 72 h nach MVMp Infektion, im Vergleich zu nicht infizierten Zellen nach 72 h. Es konnte festgestellt werden, dass die Menge an phosphorylierter cPLA₂ bereits 24 h nach der MVMp Infektion höher war als in unbehandelten Zellen. In den folgenden 24 h stieg die Menge an phosphorylierter cPLA₂ nochmals an, während sie 72 h nach der MVMp Infektion wiederum geringer zu sein schien, höchstwahrscheinlich aufgrund bereits erfolgter starker Zelllyse in den Kulturen.

Dieses Ergebnis ließ darauf schließen, dass cPLA₂ infolge der MVMp Infektion, an Serinrest 505 phosphoryliert wird. Wahrscheinlich erfolgte dieses Phosphorylierungsereignis bereits innerhalb des ersten Tages nach Infektion.

Ein weiteres wichtiges Ereignis in der Aktivierung von cPLA₂ ist die Translokation des Enzyms aus dem Zytoplasma zu intrazellulären Membrankompartimenten. Sollte es infolge der MVMp Infektion tatsächlich zu einer Aktivierung von cPLA₂ kommen, wäre auch eine intrazelluläre Relokalisation des Enzyms zu erwarten.

Zur Untersuchung der subzellulären Lokalisation von cPLA₂ wurden zunächst Fraktionierungsexperimente durchgeführt. Das Prinzip der Fraktionierung (siehe auch 2.2.5.1.2) beruhte auf unterschiedliche Zentrifugationsschritte, die es

ermöglichten, mindestens fünf verschiedene subzelluläre Fraktionen, schematisch dargestellt in Abb. 3-15, voneinander zu separieren.

Die Fraktionierung wurde auf Zellen angewandt, welche 36 h zuvor mit MVMp (MOI 10 RU / Zelle) infiziert oder nicht infiziert worden waren. Zu diesem Zeitpunkt war einerseits die erfolgte Phosphorylierung von cPLA₂ zu erwarten (siehe oben), andererseits konnte davon ausgegangen werden, dass die Lyse der infizierten Zellen noch nicht eingesetzt hatte (siehe Kapitel 3.1).

Die Analyse der verschiedenen

Fraktionen erfolgte im Western Blot. Das analysierte Volumen einer jeden Fraktion wurde auf 0.1 % des in der Fraktionierung eingesetzten Gesamtzellextraktvolumens normalisiert. β -Tubulin, wurde zur Kontrolle der Reinheit nicht löslicher Membranfraktionen und somit der Genauigkeit des Fraktionierungsprotokolls detektiert.

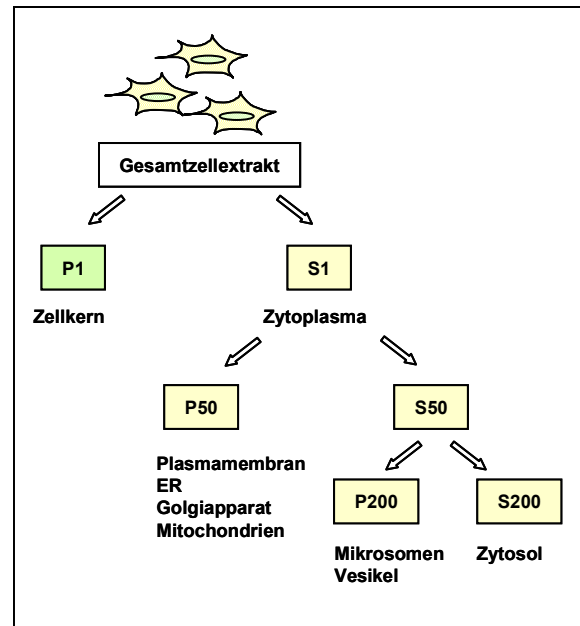


Abb. 3-15: Subzelluläre Fraktionen.

MVMp oder nicht infizierte Zellen wurden zur Präparation von Gesamtzellextrakten verwendet. Durch differentielle Zentrifugation (siehe 2.2.5.1.2) konnten anschließend die verschiedenen subzellulären Fraktionen voneinander getrennt werden.

Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 3-16 A dargestellt. Es zeigt, dass abgesehen von sehr leichten Kontaminationen in Fraktion P1 und P200, β -Tubulin hauptsächlich in den Fraktionen S1 und S200 nachweisbar war. Im Hinblick auf die Lokalisation von cPLA₂ belegt die Fraktionierung nicht infizierter Zellen, dass es sich hierbei um ein im Zytosol lokalisiertes Enzym handelt, da die Hauptmenge dieses Proteins in der S200 Fraktion des Gesamtzytoplasmas (S1) zu finden war. Die schwache Bande in der Kernfraktion P1 war höchstwahrscheinlich auf die leichte zytoplasmatische Kontamination dieser Fraktion zurückzuführen. Im Bezug auf die Lokalisation der cPLA₂ in MVMp infizierten Zellen konnte tatsächlich eine Zunahme des Enzyms in den die Membrankompartimente repräsentierenden Fraktionen P50 und P200 beobachtet werden. Hierbei handelte es sich um die Plasmamembran, Organellen des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgiapparates und um

Mitochondrien (P50) bzw. um Vesikel oder Mikrosomen (P200). Zusätzlich fiel eine Abnahme der cPLA₂ Menge in der S200 Fraktion, verglichen mit nicht infizierten Zellen, auf. Eine Lokalisation der cPLA₂ in den Fraktionen P50 und P200 konnte in nicht infizierten Zellen nicht festgestellt werden.

Dieses Ergebnis sprach für die Translokation des Enzyms vom zytosolischen Teil der Zelle zu Membrankompartimenten infolge der MVMp Infektion.

Durch folgende Immunfluoreszenzanalysen sollte dieses Ergebnis verifiziert werden. Hierzu wurde cPLA₂ in MVMp infizierten oder nicht infizierten Zellen durch ein polyklonales Antiserum und einen AlexaFluor®488-konjugierten Sekundärantikörper angefärbt (siehe 2.1.8). Das Ergebnis, dargestellt in Abb. 3-16 B, zeigte, dass die cPLA₂ in nicht infizierten Zellen im gesamten Zytoplasma der Zelle, unspezifisch verteilt, vorliegt. Dies ist ein für Fibroblasten typisches Muster inaktiver cPLA₂ (Bunt *et al.*, 1997). Nach MVMp Infektion kann jedoch eine deutliche Veränderung beobachtet werden. Das Enzym schien sich perinukleär in granulärer Form zu konzentrieren, wie durch die weißen Pfeile angedeutet. In diesem Experiment betrug die infektiöse Rate, gezeigt durch die Anfärbung des NS1 Proteins in Abb. 3-16, 93.75%.

Das Ergebnis dieser Immunfluoreszenzanalyse bestätigte eine grundlegende Veränderung der intrazellulären cPLA₂ Lokalisation nach MVMp Infektion, indem in infizierten Zellen eine perinukleäre Anreicherung des Enzyms nachgewiesen werden konnte.

Zusammenfassend soll an dieser Stelle festgehalten werden, dass durch die gezeigten Ergebnisse nicht nur die für die katalytische Aktivität der cPLA₂ absolut essentielle Phosphorylierung an Serinrest 505, sondern außerdem die Translokation des Enzyms zu perinukleären Membrankompartimenten der Zelle gezeigt werden konnte. Damit waren die Hauptmerkmale der Aktivierung zellulärer cPLA₂ als Folge der MVMp Infektion nachgewiesen.

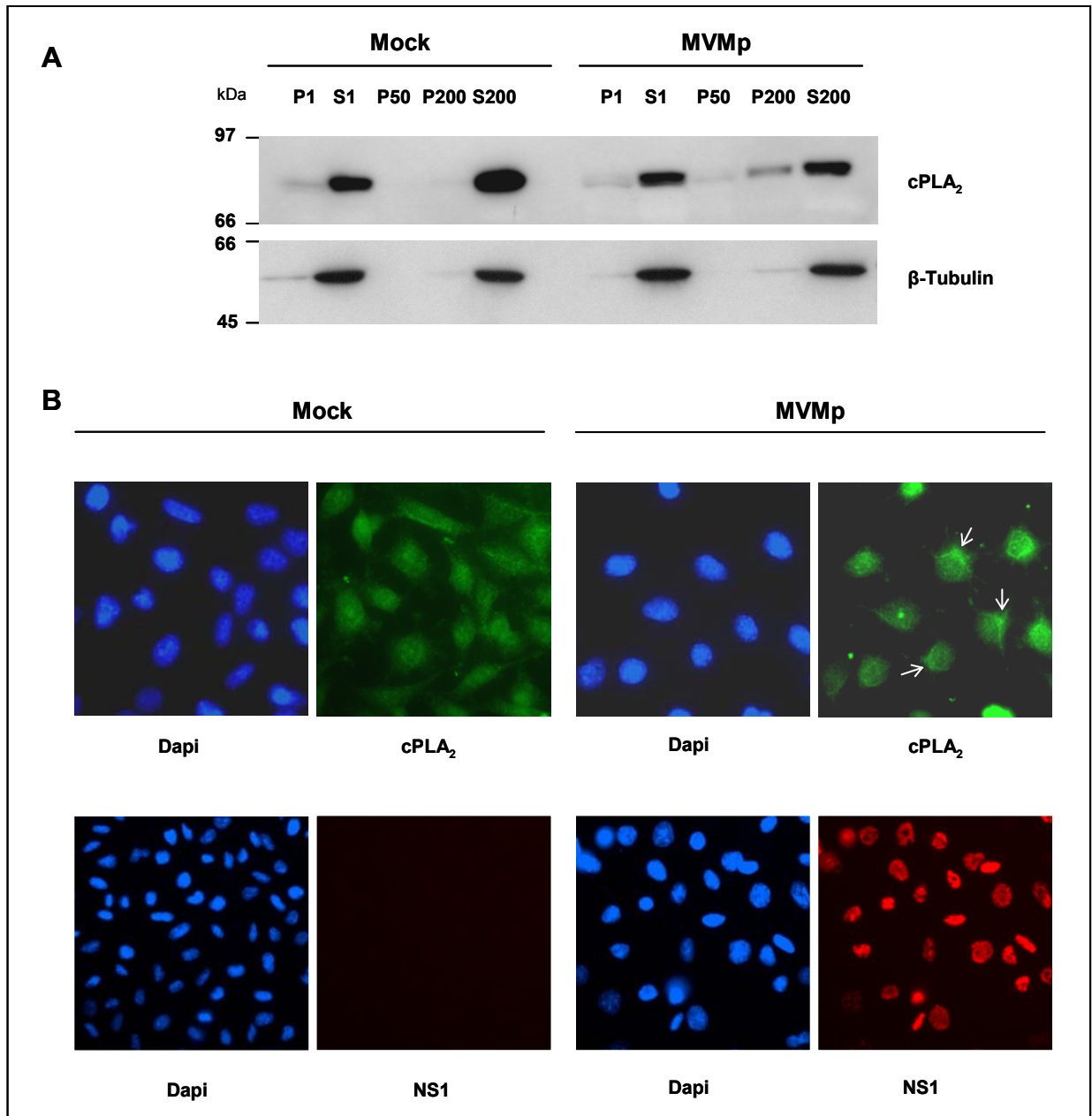


Abb. 3-16: Intrazelluläre cPLA₂ Translokation nach der MVMp Infektion.

A9 Zellen wurden mit MVMp (MOI 10 RU / Zelle) oder nicht (Mock) infiziert und 36 h nach der Infektion zur Präparation subzellulärer Fraktionen geerntet. Durch differentielle Zentrifugation konnten 5 Fraktionen voneinander separiert werden: P1 (Zellkerne), S1 (Zytoplasma), P50 (Plasmamembran, Endoplasmatisches Retikulum, Golgiapparat und Mitochondrien), P200 (Mikrosomen, Vesikel) und S200 (Zytosol) (siehe Abb.3-15). Das zu analysierende Volumen einer jeden Fraktion wurde auf 0.1 % des in der Fraktionierung initial eingesetzten Gesamtzellextraktvolumens normalisiert. Die Fraktionen wurden in einer 10%igen SDS PAGE aufgetrennt und im Western Blot, unter Verwendung eines monoklonalen cPLA₂ Antikörpers und eines monoklonalen β -Tubulin Antikörpers (siehe 2.1.8), analysiert (**A**). Als Molekulargewichtsstandard diente der RainbowTM Marker (Amersham). (**B**) Auf *spot slides* infizierte Zellen wurden 36 h nach der Infektion fixiert und zur Detektion zellulärer cPLA₂ mit einem polyklonalen cPLA₂ spezifischen Antiserum und einem AlexaFluor488[®]-konjugierten Sekundärantikörper (siehe 2.1.8) für die Immunfluoreszenzfärbung verwendet. Zelluläre DNA wurde mit Dapi und das NS1 Protein mit dem 3D9 Antikörper und einem AlexaFluor594[®]-konjugierten Sekundärantikörper angefärbt. Die photographische Dokumentation erfolgte bei 63facher Vergrößerung für cPLA₂ und bei 40facher Vergrößerung für NS1.

3.4.1.2 MAPK Phosphorylierung

Die Aktivierung von Kinasen der MAPK-Familie stellt eine sehr wichtige Voraussetzung für die Phosphorylierung und somit die katalytische Aktivität von cPLA₂ dar. Einerseits sind p44/42, auch bekannt als ERK-1 bzw. -2 (*extracellular signal regulated kinase -1, -2*), und andererseits p38 MAPK als katalysierende Enzyme der Phosphorylierung von cPLA₂ an Serinrest 505 beschrieben worden.

Basierend auf den zuvor beschriebenen Experimenten, die eindeutig die Phosphorylierung der cPLA₂ an Serinrest 505 nach der MVMp Infektion gezeigt hatten, stellte sich nun auch die Frage nach dem Phosphorylierungsstatus der p38 bzw. p44/42 MAPK in MVMp infizierten Zellen. Auch zu diesem Zweck wurden die Zellen 36 h nach Infektion zur Präparation von Gesamtzellproteinextrakten geerntet. Die Analyse erfolgte im Western Blot. Dabei wurden die phosphorylierten, phospho-p38 oder phospho-p44/ phospho-p42 MAPK, bzw. nicht-phosphorylierten Proteinspezies, p38 oder p44/42 MAPK, jeweils mit spezifischen Antisera detektiert (siehe 2.1.8).

Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abb. 3-17 veranschaulicht. Unter Berücksichtigung leichter Schwankungen in der Ausgangsmenge der analysierten Proben, die durch die Detektion von β -Tubulin erkannt werden konnten, zeigte das Experiment, dass sowohl die Menge an phosphorylierter p44/42 MAPK (Abb. 3-17 A) als auch phosphorylierter p38 MAPK (Abb. 3-17 B) schon 24 h nach Infektion deutlich höher war, als in unbehandelten Zellen 72 h nach Infektion. 48 h nach Infektion schien die Menge der phosphorylierten Form beider MAPK Spezies einen Höhepunkt zu erreichen, da 24 h später ein Rückgang in der Intensität der Bande, vor allem für phospho-p44 und phospho-p42 MAPK, zu erkennen ist. Dies kann sehr wahrscheinlich auf die 72 h nach Infektion bereits eingesetzte Zelllyse zurückgeführt werden. Diese Annahme wurde zusätzlich dadurch bestätigt, dass auch die Gesamtmenge der jeweiligen MAPK, detektiert durch ein Antiserum welches beide Formen des jeweiligen Enzyms erkennt, 72 h nach Infektion deutlich zurückging, während sie über 48 h hinweg zunächst unverändert blieb. Im Vergleich zu nicht infizierten Zellen konnte außerdem keine erhöhte Gesamtmenge an p38 bzw. p44/42 MAPK beobachtet werden. Die zeitlich bedingte Zunahme der MAPK-Phosphorylierung ließ interessanterweise sehr große Ähnlichkeit zur zeitlichen

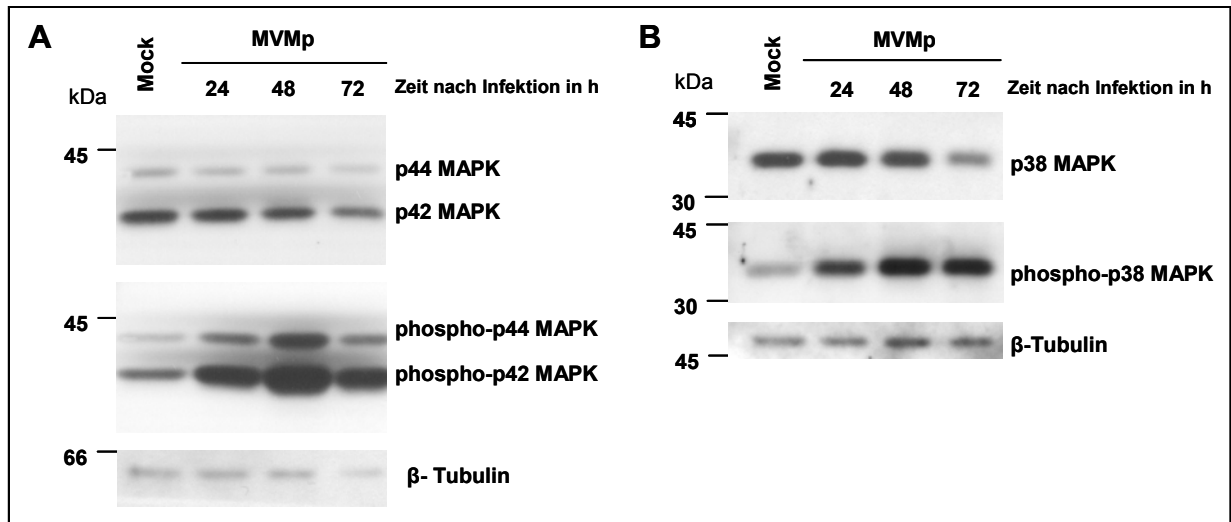


Abb.3-17: MAPK Aktivierung nach der MVMp Infektion.

MVMp (MOI 10 RU / Zelle) infizierte Zellen wurden 24, 48 und 72 h nach der Infektion zur Präparation von Gesamtzellproteinextrakten verwendet. Nicht infizierte (Mock) Zellen wurden 72 h nach der Infektion präpariert. 25µg Protein der jeweiligen Probe wurden in der 10%igen SDS PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Die Detektion des absoluten MAPK Spiegels erfolgte mit p44/42 MAPK- bzw. p38 MAPK-spezifischen polyklonalen Antisera, die Detektion der jeweiligen phosphorylierten Formen erfolgte mit phospho-p44/42 MAPK- bzw. phospho-p38 MAPK- spezifischen polyklonalen Antisera (siehe 2.1.8.). Als Kontrolle wurde β-Tubulin mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper nachgewiesen. Als Molekulargewichtsstandard diente der RainbowTM Marker (Amersham).

Veränderung der cPLA₂-Phosphorylierung an Serinrest 505 erkennen. Die gezeigten Ergebnisse deuteten somit auf die virusinduzierte Aktivierung von p38 und p44/42 MAPK hin und lieferten einen weiteren Hinweis für die MVMp induzierte Aktivierung zellulärer cPLA₂.

Mit den hier gezeigten Ergebnissen wurden die für eine Aktivierung zellulärer cPLA₂ wichtigen Hauptmerkmale, nämlich die für die katalytische Aktivität des Enzyms wichtige Phosphorylierung des Serinrest 505, die intrazelluläre Translokation des Enzyms, sowie die Aktivierung von MAPK, in MVMp infizierten Zellen nachgewiesen. Basierend auf diesen Ergebnissen kann gefolgert werden, dass zelluläre cPLA₂ mit sehr hoher Wahrscheinlichkeit eine wesentliche Schlüsselfunktion in der MVMp induzierten Zellyse hat.

3.4.2 Zelluläre sPLA₂

Aus Ergebnissen unter Verwendung unterschiedlicher inhibitorischer Substanzen für zelluläre PLA₂ (Kapitel 3.3) konnte eine zentrale Funktion zellulärer sekretorischer PLA₂ (sPLA₂) in der MVMp induzierten Zellyse nicht vollständig ausgeschlossen werden.

Die Aktivierung der sPLA₂ Enzyme ist stark vom betrachteten sPLA₂ Subtyp abhängig.

Die generellen Möglichkeiten der sPLA₂ Aktivität sind in Abb. 3-18 vereinfacht zusammengefasst. Normalerweise werden in intrazellulären Vesikeln gelagerte sPLA₂ Enzyme vor der eigentlichen hydrolytischen Aktivität zunächst von der Zelle auto- oder parakrin sezerniert. Sezernierte sPLA₂ kann entweder direkt Phospholipide der

äußeren Plasmamembran hydrolysieren, oder aber nach Bindung an membranständiges HSPG (Heparansulfatproteoglykan) wieder reinternalisiert werden. In diesem Fall hydrolysiert sPLA₂ Phospholipide an intrazellulären Membranen. Kürzlich veröffentlichte Untersuchungen beschreiben allerdings einen sPLA₂ Funktionsmechanismus, der ohne vorherige Sekretion des Enzyms, auf einer direkten intrazellulären Aktivität beruht. Weiterhin können die verschiedenen Subtypen zellulärer sPLA₂ auch auf transkriptioneller Ebene reguliert werden. Dies macht deutlich, dass in der Untersuchung einer Aktivierung zellulärer sPLA₂ die große Komplexität dieser Enzymgruppe beachtet werden muss. Diese Komplexität gestaltet es schwer, genaue Hauptmerkmale der sPLA₂ Aktivierung zu benennen.

In der vorliegenden Arbeit war vorgesehen, die Sekretion des Enzyms, seine Assoziation an membranständiges HSPG, eine erhöhte mRNA Expression bzw. eine mögliche Veränderung der intrazellulären Lokalisation des Enzyms als Merkmale der sPLA₂ Aktivierung zu berücksichtigen.

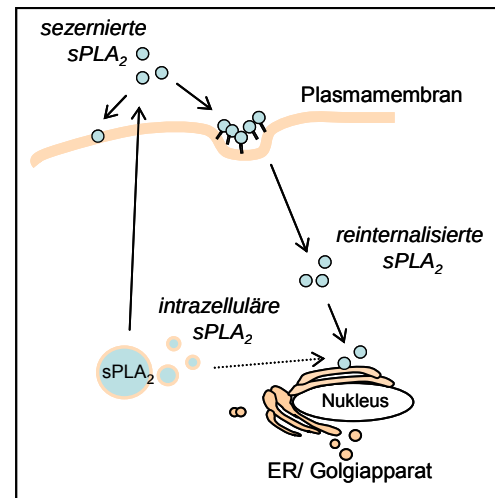


Abb.3-18: Vereinfachte Darstellung der Funktionsmechanismen zellulärer sPLA₂.

Intrazellulär gespeicherte sPLA₂ wird einerseits in den Extrazellulärraum sezerniert, wo sie, auto- oder parakrin, Phospholipide der Plasmamembran hydrolysiert oder aber, gebunden an Heparansulfatproteoglykan (HSPG), endozytotisch reinternalisiert wird. sPLA₂ kann möglicherweise auch ohne zuvor sekretiert worden zu sein, an intrazellulären Membranen agieren.

3.4.2.1 Sekretion von sPLA₂ nach MVMP Infektion

3.4.2.1.1 Nachweis sezernierter sPLA₂ durch sPLA₂ Aktivitätsassay

Zur Untersuchung einer möglichen Aktivierung zellulärer sPLA₂ infolge einer MVMP Infektion, sollte in infizierten Zellen zunächst eine Sekretion aktiver sPLA₂ ins Kulturmedium überprüft werden. Würde es durch die Infektion mit MVMP zu einer Freisetzung extrazellulär aktiver sPLA₂ kommen, sollte es somit möglich sein, diese mit der folgenden Methode zu quantifizieren.

Zur Bestimmung der enzymatischen sPLA₂ Aktivität in den Kulturüberständen MVMP infizierter Zellen wurde in Zusammenarbeit mit Frau M. Kazkin (Universität Frankfurt) ein sPLA₂-Aktivitätsassay durchgeführt (Märki und Franson, 1986; Beck *et al.*, 2003). Das Versuchsprinzip basierte auf der Hydrolyse von [¹⁴C]-Ölsäure-markierten *E.coli* Membranen durch möglicherweise in der Probe vorhandene sPLA₂. Freigesetzte [¹⁴C]-Ölsäure kann im Überstand der Reaktion gemessen werden. Um im Falle einer sPLA₂ Sekretion in den extrazellulären Raum, einer starken Verdünnung des Enzyms im Medium entgegenzuwirken, wurde das Mediumvolumen der MVMP oder nicht infizierten Kultur von normalerweise 5 ml auf 2 ml verringert. An sechs verschiedenen Zeitpunkten innerhalb von 3 Tagen nach Infektion wurden 5 µl der Kulturüberstände im sPLA₂ Aktivitätsassay eingesetzt (siehe 2.2.1.8). Als Positivkontrolle dienten in diesem Experiment IL-1β stimulierte Mesangiumzellen, für welche bereits in verschiedenen Zusammenhängen eine hohe Ausschüttung von sPLA₂ in den Kulturüberstand nachgewiesen wurde (Märki und Franson, 1986; Huwiler *et al.*, 1997; Vervoordeldonk *et al.*, 1997; Scholz *et al.*, 1999; Beck *et al.*, 2003b).

Die jeweils aus den radioaktiv markierten *E.coli* Membranen freigesetzte [^{14}C]-Menge ist in Abb. 3-19 graphisch veranschaulicht. Dargestellt sind die Mittelwerte einer doppelten Bestimmung. Die in der Mediumkontrolle gemessene Hintergrundmenge betrug 455 cpm und wurde von der in der jeweiligen Probe gemessenen [^{14}C]-Menge subtrahiert. Die Ergebnisse zeigten, dass fast über den gesamten Versuchszeitraum hinweg, die durch nicht infizierte Zellen freigesetzte [^{14}C]-Menge

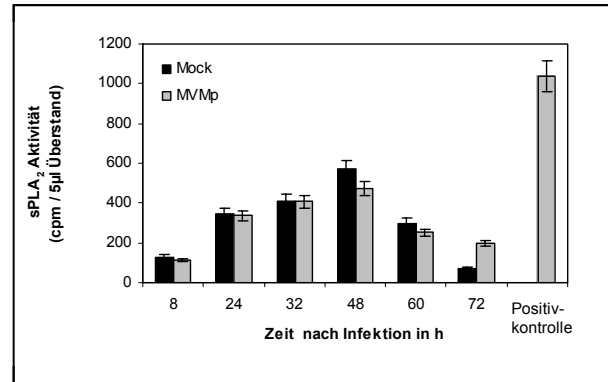


Abb. 3-19: sPLA₂ Aktivität in Kulturüberständen MVMp infizierter Zellen. Kulturüberstände MVMp (MOI 10 RU / Zelle) oder nicht (Mock) infizierter Zellen wurden an den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion gesammelt und zur Bestimmung sezernierter sPLA₂ Aktivität an [^{14}C]-Ölsäure markierten *E. coli* Membranen verwendet (siehe Text und 2.2.1.8.). Als Positivkontrolle dienten IL-1 β stimulierte Mesangiumzellen (▨). Dargestellt sind die Mittelwerte aus einer Doppelsbestimmung der freigesetzten [^{14}C]-Ölsäure Menge in cpm.

mindestens eben so hoch ist, wie die der MVMp infizierten Zellen. Angefangen am Zeitpunkt von 8 h nach Infektion stieg die sezernierte sPLA₂ Aktivität bis 48 h nach Infektion auf fast 600 cpm, nahm dann aber wieder ab. 72 h nach Infektion war die sPLA₂ Aktivität im Überstand MVMp infizierter Zellen hingegen mit 195.5 cpm mehr als doppelt so hoch wie für nicht infizierte Zellen (72.5 cpm). Die Ursache für eine anscheinende Stimulation der sPLA₂ Sekretion nicht infizierter Zellen konnte nicht gefunden werden. Die Vermutung, dass es sich mit 5 % FCS, einem sPLA₂ Stimulator, um eine zu hohe Serumkonzentration in der Zellkultivierung handelte, konnte nicht bestätigt werden, da ein gleicher experimenteller Ansatz unter Verwendung von 0.5 % FCS Medium keinen Einfluss auf das Testergebnis hatte. Das Ergebnis dieser Versuche ließ somit vermuten, dass die MVMp Infektion wahrscheinlich nicht zu einer Anreicherung katalytisch aktiver sPLA₂ im Überstand der Kulturen führte.

3.4.2.1.2 Nachweis sezernierter sPLA₂ durch Präzipitation

Neben den extrazellulär aktiven sPLA₂ Subtypen, die direkt an der Plasmamembran zu einer Hydrolyse von Phospholipiden führen, können andere nach einer

Anreicherung in Membranmikrodomänen reinternalisiert werden und prägen ihre katalytische Aktivität somit nicht außerhalb, sondern erst innerhalb der Zelle aus. Diese sPLA₂ Subtypen können in der Analyse von Kulturüberständen mit dem Aktivitätsassay also nicht erfasst werden.

In der weiteren Untersuchung einer möglichen Sekretion zellulärer sPLA₂ nach MVMp Infektion sollte dies berücksichtigt werden. Somit wurden Versuche unternommen, das Enzym, unabhängig von einer vorhandenen oder nicht vorhandenen enzymatischen Aktivität, aus den Überständen anzureichern.

Im ersten Ansatz wurde versucht, potentiell im Kulturüberstand vorhandene sPLA₂ durch Immunpräzipitation (siehe 2.2.5.7.3) unter Verwendung eines polyklonalen anti-sPLA₂ Antiserums zu binden und schließlich im Western Blot zu detektieren.

Der zweite Ansatz bestand darin, das eventuell sezernierte Protein durch Trichloressigsäure (TCA) zu fällen (siehe 2.2.5.3). TCA eignet sich besonders gut zur Ausfällung von Proteinen, welche in Konzentrationen von > 5 µg / ml in Lösung vorliegen, wie etwa in supplementierten Kulturmedien. Das Präzipitat konnte anschließend in der SDS PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert werden.

Der dritte Ansatz, sezernierte sPLA₂ im Kulturüberstand nachzuweisen, beruhte auf der starken Bindungsaffinität einiger kationischer sPLA₂ Subtypen für Heparin (Murakami *et al.*, 1993; Lomonte *et al.*, 1994; Murakami *et al.*, 1996; Murakami *et al.*, 1998). Durch die Zelle sezernierte sPLA₂ kann möglicherweise durch die Bindung an HSPG direkt an der Plasmamembran verbleiben (Murakami *et al.*, 2000). Heparin ist nicht plasmamembrangängig und konkurriert mit HSPG um die Bindung sezernierter sPLA₂. Einerseits inhibiert Heparin so eine Reinternalisierung des Enzyms, andererseits kann das Protein auf diese Weise angereichert werden (Barbour und Dennis, 1993; Balboa *et al.*, 2003; Mounier *et al.*, 2004). Die zu untersuchenden Zellen wurden hierzu 48 h nach Infektion mit 50 U / ml Heparin behandelt (siehe 2.2.5.4.) und die Überstände im Western Blot analysiert.

Die Auswertung sämtlicher Versuche der drei beschriebenen Ansätze ergab, dass es nicht möglich war, sezernierte sPLA₂ aus den Kulturüberständen anzureichern (nicht gezeigt).

Die Ergebnisse dieser Experimente bestätigten die aus dem vorhergehenden sPLA₂-Aktivitätsassay hervorgegangene Vermutung, dass die Infektion mit MVMp

wahrscheinlich nicht zur Sekretion zellulärer sPLA₂ in den extrazellulären Raum führte.

3.4.2.2. sPLA₂ Subtypisierung von A9 Fibroblasten

Wie zuvor erwähnt, können je nach Subtyp einige sPLA₂ Enzyme auch unabhängig von einer Sekretion, hydrolytische Aktivität haben. Für das weitere Verständnis einer möglichen Aktivierung zellulärer sPLA₂ nach erfolgter MVMp Infektion, sollten die hier verwendeten A9 Fibroblasten, hinsichtlich exprimierter sPLA₂ Subtypen charakterisiert werden. Ferner war auch von Interesse, ob die in A9 Zellen exprimierten Subtypen einer transkriptionellen Regulation nach der MVMp Infektion unterliegen. Eine Überexpression der sPLA₂ mRNA könnte einen Hinweis auf den Beitrag der sPLA₂ in der MVMp vermittelten Zelllyse liefern.

Hierzu wurden die Zellen 24 h nach MVMp (MOI 10 RU / Zelle) Infektion zur mRNA-Präparation verwendet. Die anschließend durch reverse Transkription gewonnene cDNA wurde mit in 2.1.4.1. angegebenen sPLA₂ subtypspezifischen *Primern* in der PCR analysiert. Mithilfe der RT-PCR konnte so, semi-quantitativ, ein Eindruck über das Expressionsmuster der verschiedenen sPLA₂ Subtypen nach der MVMp Infektion gewonnen werden. Die PCR sämtlicher Proben mit einem *Primer* für das in allen Proben enthaltene *housekeeping* Gen GAPDH (Glycerinaldehyd-3phosphat-dehydrogenase) stellte sicher, dass in allen Proben gleiche Mengen an RNA für den Versuchsansatz eingesetzt wurden. Zur Kontrolle des Infektionsablaufs, wurden außerdem NS/VP Transkripte nachgewiesen.

Aus dem Ergebnis dieser Analyse, gezeigt in Abb. 3-20, ging hervor, dass von den neun untersuchten sPLA₂ Subtypen zumindest die Subtypen -IB, -IIA, -IIE, -V und -XII-1, in A9 Fibroblasten exprimiert werden. Auch wenn bzgl. der sPLA₂ Subtypen -IB und -IIA leichte Intensitätsunterschiede in den Banden sichtbar sind, konnten im Vergleich der Versuchsansätze nicht infizierter mit denen MVMp infizierter Zellen keine relativen Veränderungen auf mRNA Ebene nachgewiesen werden.

Interessanterweise gehören insbesondere die Subtypen -IIA und -V zu denjenigen sPLA₂ Enzymen, die erst nach einer Reinternalisation in die Zelle hydrolytisch aktiv sind (Murakami und Kudo, 2001). Eine Regulation der identifizierten sPLA₂ Subtypen

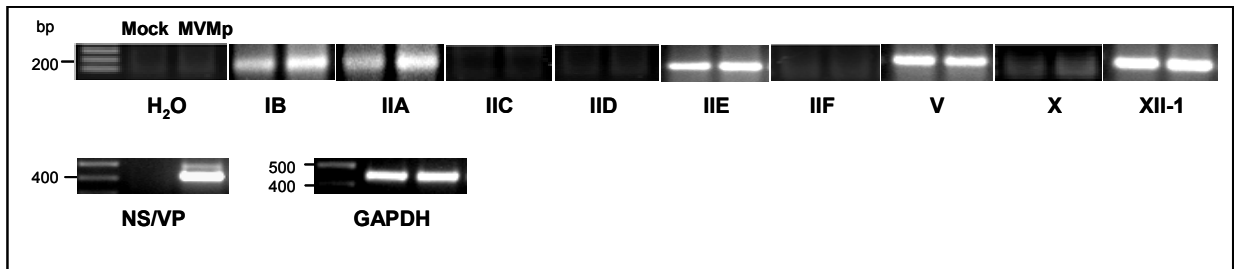


Abb. 3-20: RT-PCR zur sPLA₂ Subtypisierung in MVMp infizierten A9 Zellen.

A9 Zellen wurden mit MVMp (MOI 10 RU / Zelle) oder nicht (Mock) infiziert und 24 h später zur mRNA Extraktion verwendet. Die RNA wurde in cDNA umgeschrieben und in verschiedenen PCR Reaktionen eingesetzt. Die Reaktionen enthielten entweder spezifische *Primer*paare für die angegebenen sPLA₂ Subtypen IB, IIA, IIC, IID, IIE, IIF, V, X oder XII-1, für das *housekeeping* Gen GAPDH oder für die viralen NS / VP Gene. Zur Kontrolle der PCR enthielt ein Ansatz H₂O anstelle des *Primers*. Als Molekulargewichtsstandard diente GeneRuler™ (1kb DNA ladder, Fermentas).

auf transkriptioneller Ebene konnte nach MVMp Infektion jedoch nicht festgestellt werden.

3.4.2.3 Untersuchung der in A9 Fibroblasten exprimierten sPLA₂ Subtypen auf Proteinebene

Nach der Charakterisierung der A9 Zellen in den sPLA₂ Subtypen auf mRNA Ebene stellte sich unmittelbar die Frage nach der Expression dieser Subtypen als Protein. Hierzu wurden Gesamtproteinextrakte MVMp und nicht infizierter Zellen im Vergleich zu rekombinanten sPLA₂ -IB, -IIA, -IIE und -V Proteinen (zur Verfügung gestellt durch G. Lambeau, Universität Valbonne / Frankreich) in der SDS-PAGE aufgetrennt und schließlich mit entsprechenden polyklonalen Antisera gegen die verschiedenen sPLA₂ Subtypen im Western Blot analysiert.

Abb. 3-21 zeigt das Ergebnis der Western Blot Analyse für sPLA₂ -IB. Wie im linken Teil der Abbildung deutlich wird, migrierte das rekombinante Protein im Gel etwas höher als die 13.7 kDa Bande des Standards und zeigte somit das typische Molekulargewicht der sPLA₂ -IB von ca. 14 kDa. Eine solche Bande konnte im Proteinextrakt MVMp oder nicht infizierter Zellen nicht detektiert werden, hingegen vielen eine Reihe offensichtlich unspezifisch detektierter Banden auf. Um auszuschließen, dass Faktoren in den Proteinextrakten das Migrationsverhalten der sPLA₂ beeinflussten, wurde die sogenannte *spiking*-Methode angewandt. Hierbei wurden zum jeweiligen Gesamtzellproteinextrakt 25 ng rekombinante sPLA₂ -IB hinzugefügt. Sollte sich die Annahme bestätigen, würde sich das Laufverhalten des rekombinanten Proteins ändern. Der rechte Teil der Abb. 3-21 zeigt allerdings, dass

dies nicht der Fall war. Das rekombinante sPLA₂-IB Protein migriert auch vor dem Gesamtzellprotein Hintergrund etwas oberhalb der 13.7 kDa Bande des Molekulargewichtsstandards. Die hier für sPLA₂-IB beschriebene Analyse wurde für die vier bereitgestellten rekombinanten Proteine und zugehörigen Antisera der sPLA₂ Subtypen -IB, -IIA, -IIE und -V durchgeführt. Für keinen dieser, zuvor in der RT-PCR nachgewiesenen sPLA₂ Subtypen, konnte das entsprechende Protein im Western Blot detektiert werden.

Als Ergebnis dieser Experimente konnte eine Expression der in A9 Zellen auf mRNA Ebene nachgewiesenen sPLA₂ Subtypen -IB, -IIA, -IIE, -V und -XII-1 auf Proteinebene nicht bestätigt werden.

Die Untersuchung subzellulärer Veränderungen der sPLA₂ Lokalisation, stellt eine weitere Möglichkeit dar, Hinweise auf eine Funktion der Enzyme in der MVMP Infektion zu erhalten. Wie aus Abb. 3-21 deutlich wird, ergab die Anwendung der subtypspezifischen polyklonalen Antisera zum Teil eine hohe Anzahl unspezifischer Banden in der Analyse der Gesamtzellproteinextrakte, was auf die unspezifische Bindung anderer zellulärer Proteine durch die Antisera schließen lässt. Auch eine Verwendung dieser Antikörper in der Immunfluoreszenzanalyse stellte sich aufgrund der Unspezifität als ungeeignet heraus.

Zusammenfassend ist festzustellen, dass sich mithilfe der gezeigten Versuchsansätze keine Sekretion einer enzymatisch aktiven sPLA₂ in den Extrazellularraum oder eine membranassoziiierende sPLA₂ nachweisen ließ. Die sPLA₂ Subtypisierung von A9 Zellen ergab, dass sPLA₂-IB, -IIA, -IIE, -V und -XII-1 mRNAs vorliegen, eine

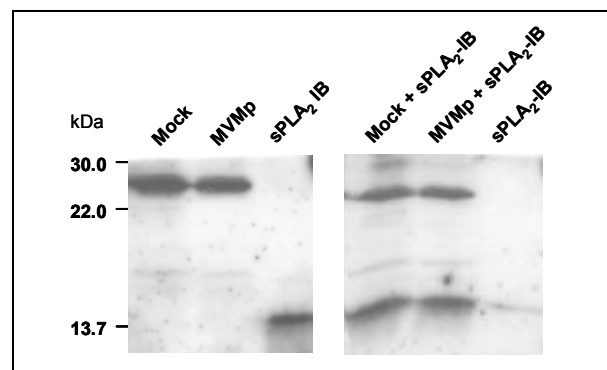


Abb.3-21: Detektion von Subtyp sPLA₂-IB im Western Blot.

MVMP (MOI 10 RU / Zelle) oder nicht (Mock) infizierte Zellen wurden 36 h nach Infektion zur Präparation von Gesamtzellproteinextrakten geerntet. 50 µg Gesamtzellprotein bzw. 25 ng rekombinantes Protein sPLA₂-IB (linker Teil der Abbildung) oder 50 µg Gesamtzellprotein, jeweils versetzt mit 25 ng rekombinantem Protein (*spiking*) (rechter Teil der Abbildung) wurden in der 12%igen SDS PAGE aufgetrennt und im Western Blot mit einem polyklonalen sPLA₂-IB spezifischen Antiserum (2.1.8.) analysiert. Als Molekulargewichtsstandard diente der Kaleidoscope Polypeptid Standard (*low range*) von BioRad.

Regulation der Enzyme nach MVMP Infektion konnte auf transkriptioneller Ebene jedoch nicht festgestellt werden. Die Proteine der als mRNA identifizierten sPLA₂ Subtypen konnten nicht nachgewiesen werden.

Die gezielte Untersuchung nicht sezernierter, intrazellulär aktiver sPLA₂ Enzyme in der MVMP induzierten Zellyse war bisher nicht möglich. Selektive, die Plasmamembran durchdringende, sPLA₂ Inhibitoren sowie spezifische Antikörper würden diese Untersuchung ermöglichen, sind aber nicht verfügbar.

In diesem Kapitel wurde gezeigt, dass durch eine Behandlung MVMP infizierter Zellen mit Inhibitoren für zelluläre cPLA₂ und sPLA₂ Enzyme die virusinduzierte Freisetzung von AA und die Zellyse spezifisch gehemmt wurden. In der Untersuchung einer möglichen Aktivierung dieser Enzyme infolge der MVMP Infektion konnten die Hauptmerkmale einer Aktivierung zellulärer cPLA₂ eindeutig nachgewiesen werden. Dies gab Anlaß zu der Schlußfolgerung, dass zelluläre cPLA₂ in der MVMP induzierten Freisetzung von AA und der Zellyse von zentraler Bedeutung ist. Eine Aktivierung zellulärer sPLA₂ nach MVMP Infektion von A9 Zellen konnte hingegen nicht festgestellt werden, ist aber dennoch nicht ausgeschlossen.

3.5 Virale Regulatoren der cPLA₂ Aktivierung

Da es sich in der beobachteten Aktivierung zellulärer cPLA₂, wie hier gezeigt, um einen MVMP induzierten Effekt handelte, stellte sich nunmehr die Frage danach, welche viruskodierten Faktoren hierbei eine aktivierende Funktion hatten. Vor allem das Kapsidprotein VP1 und die NS Proteine sollten auf eine stimulierende Wirkung untersucht werden.

3.5.1 Die parvovirale PLA₂ im Kapsidprotein VP1

Die Untersuchung einer Funktion des VP1 Proteins in der MVMP vermittelten AA-Freisetzung und Zellyse wurde bereits in Kapitel 3.2 beschrieben. Hier wurde mit verschiedenen rekombinante MVMP Viren eine mögliche Bedeutung der in der N-terminalen Domäne des Viruskapsidproteins VP1 enthaltenen parvoviralen PLA₂ Aktivität für die MVMP induzierte Zellyse untersucht. Die dort gezeigten Versuche ließen feststellen, dass die AA-freisetzende und lytische Aktivität rekombinanter, die

N-terminale VP1 Domäne exprimierender Viren im Vergleich zur AA-freisetzenden und lytischen Aktivität Kapsidprotein-deletierter Viren, stark erhöht war. Eine Mutation, die die katalytische Aktivität der parvoviralen PLA₂ unterbinden sollte, hatte allerdings keinen Einfluss auf diese Effekte.

Diese Ergebnisse ließen schlussfolgern, dass die N-terminale, ein PLA₂ Motiv enthaltende, Domäne des VP1 Proteins eine wichtige Funktion in der MVMp vermittelten AA-Freisetzung und Zelllyse hat, die aber wahrscheinlich nicht auf die katalytische Aktivität ihrer PLA₂ beruht.

3.5.2 Die NS Proteine

Die Vermutung, dass die Regulation der MVMp induzierten Aktivierung zellulärer PLA₂ auch mit den viralen NS Proteinen in Verbindung stehen könnte, basierte vor allem auf den ohnehin multifunktionellen Eigenschaften des NS1 Proteins. NS1 ist essentiell für die virale Replikation und die Transaktivierung des viralen P38 Promotors. Desweiteren wurden NS1 aber auch sehr wichtige Funktionen bezüglich der virusinduzierten Zytotoxizität zugeschrieben. Interessanterweise erfolgt die Regulation der replikativen und auch zytotoxischen NS1-Funktionen durch zeitlich differenzierte, vor allem durch Vertreter der PKC-Familie katalysierte, Phosphorylierungsvorgänge am Protein (Corbau *et al.*, 2000; Nüesch *et al.*, 2001; Daeffler *et al.*, 2003; Lachmann *et al.*, 2003). Abgesehen von NS1 scheint aber auch das NS2 Protein in die zytotoxischen Effekte des Virus involviert zu sein (Brandenburger *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 1993). Wie die NS Proteine allerdings die Umstände der Zelllyse beeinflussen, war bisher unklar.

Zur Analyse einer Funktion der NS Proteine in der MVMp induzierten, wahrscheinlich der Zelllyse vorgeschalteten Aktivierung zellulärer cPLA₂, wurde eine bereits charakterisierte MVMp Mutante verwendet (Daeffler *et al.*, 2003). Diese enthält eine T585A Mutation im C-Terminus des NS1 Proteins. Bei der gewählten Aminosäureposition handelt es sich um eine Konsensus-PKC-Phosphorylierungsstelle. Die Mutation, so konnte gezeigt werden, hat zwar keinen Einfluss auf die Produktion replikativer Nachkommenviren, führt allerdings zu einem veränderten NS1 Phosphorylierungsmuster, zu einer auf morphologischer Ebene gezeigten verminderten Zytotoxizität und außerdem zu einem verminderten lytischen Potential des Virus. Die Nukleotidsequenz, welche unter anderem für die mutierte

NS1 Region kodiert, kodiert in einem anderen Leserahmen auch für die Isoformen des NS2 Proteins. Als Konsequenz führte die Mutation des Threonin an Position 585 in NS1 außerdem zu einer Mutation im NS2 Protein, an Position 93 der Aminosäuresequenz. Es war demnach nicht ausgeschlossen, dass der beobachtete hypolytische Phenotyp auch auf Veränderungen im NS2 Protein zurückzuführen ist.

In der vorliegenden Arbeit stellte dieses MVMP Virus, im Folgenden als MVMP585A/93G benannt, ein Hilfsmittel dar, eine mögliche Bedeutung der viralen NS Proteine in der MVMP induzierten Aktivierung zellulärer PLA₂ und der Zellyse zu analysieren. Die Ergebnisse dieser Untersuchungen sind in den folgenden Kapiteln dargestellt.

3.5.2.1 Zellyse und AA-Freisetzung nach der MVMP585A/93G Infektion

In der Untersuchung einer Funktion der NS Proteine in der MVMP induzierten PLA₂ Aktivierung und Zellyse stellte sich zunächst die Frage, ob es auch nach Infektion mit dem hypolytischen MVMP585A/93G zu einer hydrolytischen Phospholipidspaltung und somit der Freisetzung von AA kommt, wie es für die Infektion mit MVMP zu beobachten war.

Parallele Zeitkurven der MVMP bzw. MVMP585A/93G induzierten Zellyse, quantifiziert im LDH-Assay, und der Freisetzung von AA aus zuvor [³H]-AA

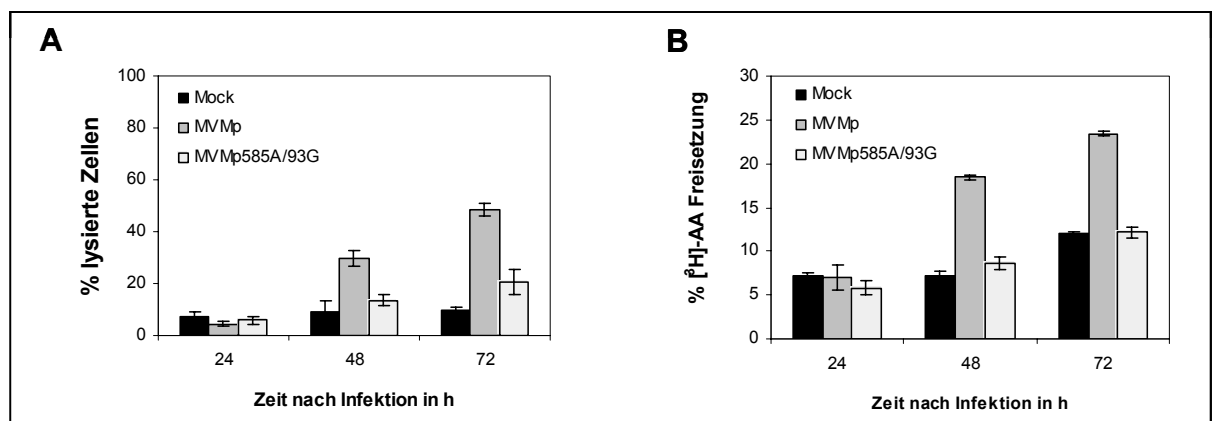


Abb. 3-22: MVMP585A/93G induzierte Zellyse und AA-Freisetzung.

Die Kulturüberstände von wildtyp MVMP (grau), MVMP585A/93G (grau/weiß) (MOI 10 RU / Zelle) oder nicht (Mock, schwarz) infizierten Zellen wurden 24, 48 oder 72h nach der Infektion zur Quantifizierung der Zellyse (LDH-Assay) (A) und [³H]-AA Freisetzung (B) verwendet. Die jeweilige Quantifizierung erfolgte wie in der Legende zu Abb.3-1 beschrieben. Die gezeigten Werte stellen unter Berücksichtigung der angegebenen Standardabweichung, Mittelwerte aus Triplikaten mehrerer unabhängiger Experimente dar.

markierten Zellen sind in Abb. 3-22 graphisch dargestellt.

Abb. 3-22 A veranschaulicht die lytische Aktivität des MVMp585A/93G Virus. Obwohl im betrachteten Versuchszeitraum von drei Tagen die lytische Aktivität des Virus angefangen bei 5.8 % lysierten Zellen zum Zeitpunkt von 24 h nach Infektion, über 13.4 % 48 h nach Infektion bis auf 20.7 % nach 72 h anstieg, wird im Vergleich zu wildtyp MVMp infizierten Zellen die sehr starke Beeinträchtigung der lytischen Aktivität dieser Viren deutlich. Die Untersuchung einer Freisetzung von [^3H]-AA durch die Infektion mit MVMp585A/93G im Vergleich zu wildtyp MVMp (Abb. 3-22 B) zeigte, dass wildtyp MVMp infizierte Zellen schon 48 h nach Infektion fast 20% [^3H]-AA freisetzen, während für MVMp585A/93G infizierte Zellen nur ein sehr leichter Anstieg auf 8.6 % erkennbar war. Bis zum Zeitpunkt von 72 h nach Infektion stieg die [^3H]-AA Menge in den Kulturüberständen dieser Zellen auch nur um ca. 3.6 % auf 12.3 % an, während für MVMp infizierte Zellen zu diesem Zeitpunkt 23.4 % der maximal freisetzbaren [^3H]-AA Menge im Kulturmedium detektierbar war.

Dies zeigte, dass die Freisetzung von AA nach Infektion mit dem hypolytischen Virus im Vergleich zu einer wildtyp MVMp Infektion stark verringert war.

3.5.2.2 PGE₂ Freisetzung nach MVMp585A/93G Infektion

Wie zuvor festgestellt, führte die Infektion des hypolytischen MVMp585A/93G Virus im Vergleich zur wildtyp MVMp Infektion zu einer stark verminderten Freisetzung von AA. Somit war es auch in der Untersuchung dieses Virus weiterhin von Interesse, die Produktion und Freisetzung PGE₂ zu analysieren. Eine PGE₂-Freisetzung ist normalerweise nur nach AA-Freisetzung zu erwarten, da die der PLA₂ nachgeschalteten COX die freie AA unmittelbar zur Produktion von Prostaglandinen und anderen Lipidmediatoren weiterverwerten. Da die MVMp585A/93G Infektion nicht zu einer Freisetzung von AA führte, war anzunehmen, dass es auch nicht zur Freisetzung von PGE₂ kommt.

Zur Analyse dieser Vermutung wurde über den Versuchszeitraum von drei Tagen die PGE₂ Menge in den Kulturüberständen MVMp585A/93G infizierter im Vergleich zu der in den Überständen wildtyp MVMp infizierter Zellen bestimmt. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 3-23 dargestellt. Die Infektion mit wildtyp MVMp, wie auch schon Kapitel 3.1. gezeigt, führte bereits 48 h nach Infektion zu einem Anstieg der PGE₂ Konzentration, die 72 h nach Infektion fast 200 ng / ml erreichte. Hingegen

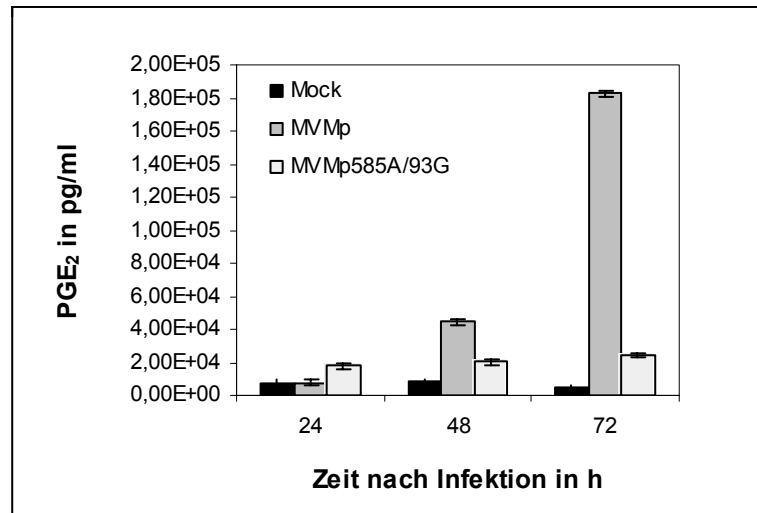


Abb.3-23: MVMp585A/93G induzierte PGE₂-Freisetzung.

Die Kulturüberstände von wildtyp MVMp (grau), MVMp585A/93G (grau/weiß) (MOI 10 RU / Zelle) oder nicht (Mock, schwarz) infizierten Zellen wurden 24, 48 oder 72 h nach der Infektion zur Quantifizierung von PGE₂ verwendet. Die Quantifizierung erfolgte wie in der Legende zu Abb.3-2 beschrieben. Die gezeigten Werte stellen unter Berücksichtigung der angegebenen Standardabweichung, Mittelwerte aus Triplikaten dar.

war die durch MVMp585A/93G infizierte Zellen freigesetzte PGE₂ Menge, 72 h nach Infektion, mit nur 24.3 ng / ml sehr stark reduziert.

Dieses Ergebnis zeigte wie vermutet, dass das hypolytische MVMp Virus, was im Vergleich zur wildtyp MVMp keine AA-Freisetzung induzierte, auch keine PGE₂ Produktion stimulierte. Die Vermutung einer direkten Korrelation zwischen virusinduzierter PLA₂ Aktivität und der Zelllyse konnte somit bestätigt werden. Die Ergebnisse deuteten darauf hin, dass die NS Proteine in diesem Zusammenhang wahrscheinlich eine wichtige Rolle spielen.

3.5.2.3 Aktivierung von MAPK und cPLA₂ nach MVMp585A/93G Infektion

Wie in Kapitel 3.4 beschrieben, kommt es infolge der MVMp Infektion zur Aktivierung zellulärer cPLA₂, was unter anderem an der Aktivierung von p38 und p44/42 MAPK sowie der Phosphorylierung und intrazellulären Translokation des Enzyms gezeigt wurde. Um die Vermutung einer prinzipiellen Bedeutung der NS Proteine in diesem, mit der Zelllyse assoziierten Vorgang weiter zu analysieren, stellte sich die Frage, ob

das Ausbleiben der AA-Freisetzung in mit dem hypolytischen MVMp585A/93G Virus infizierten Zellen eventuell auf die nicht stimulierte cPLA₂ Aktivität beruhte.

Hierzu wurden Proteinextrakte MVMp585A/93G bzw. wildtyp MVMp oder nicht infizierter Zellen hinsichtlich der Phosphorylierung von p38 und p44/42 MAPK und der Phosphorylierung von cPLA₂ untersucht. In Abb. 3-24 ist das Ergebnis dieser Analyse dargestellt. Es zeigt, dass die Zellen beider Ansätze bei gleicher NS1 Expressionsrate gravierende Unterschiede, sowohl hinsichtlich der Phosphorylierung und Aktivierung der p38 und p44/42 MAPK als auch in der Phosphorylierung des cPLA₂ Enzyms an dem für seine katalytische Aktivität essentiellen Serinrest 505 aufwiesen. Während die Infektion mit wildtyp MVMp Virus, wie schon zuvor im Detail beschrieben, zu einer Stimulation von MAPK und cPLA₂ führte, blieben diese Ereignisse bei einer MVMp585A/93G Infektion aus.

Diese Ergebnisse ließen vermuten, dass das Ausbleiben der AA-Freisetzung nach der MVMp585A/93G Infektion in der nicht erfolgten Aktivierung der MAPK und somit

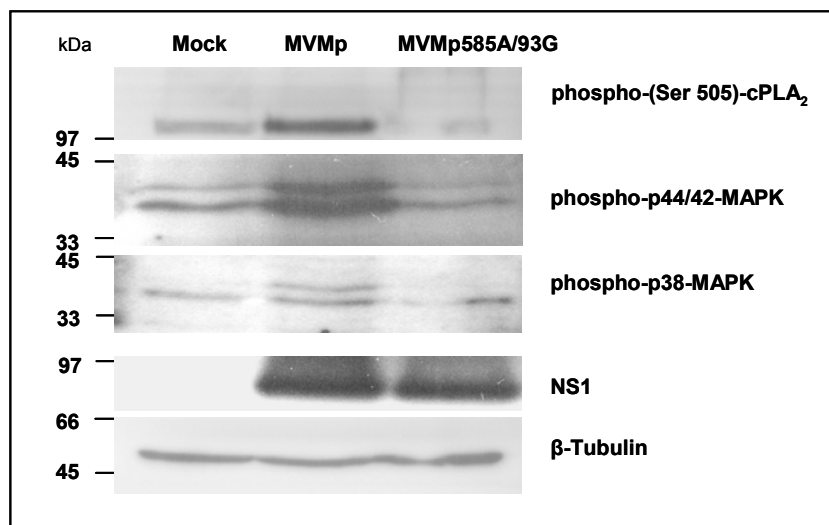


Abb. 3-24: Vergleich der MVMp585A/93G und wildtyp MVMp induzierten Aktivierung der MAPK und Phosphorylierung von cPLA₂.

MVMp, MVMp585A/93G (MOI 10 RU/Zelle) oder nicht (Mock) infizierte Zellen wurden 24 h nach Infektion zur Präparation von Gesamtzellproteinextrakten geerntet. Jeweils 25 µg Protein wurden in der 10%igen SDS PAGE aufgetrennt und im Western Blot analysiert. Hierzu wurde ein für den in cPLA₂ phosphorylierten Serinrest 505 spezifisches Antiserum, ein für phosphorylierte p38 bzw. p44/42 MAPK spezifisches Antiserum, sowie ein NS1-spezifisches Antiserum (SP8) verwendet (siehe 2.1.8). β-Tubulin wurde als Kontrolle nachgewiesen. Als Molekulargewichtsstandard dient der RainbowTM Marker (Amersham).

inaktiven cPLA₂ begründet lag.

Es konnte folglich die Annahme bestätigt werden, dass die viralen NS Proteine die MAPK-abhängige Aktivierung der cPLA₂ regulatorisch beeinflussen. Da der virusinduzierten Zelllyse offensichtlich eine Freisetzung von AA vorausgehen muss, war zu vermuten, dass der hypolytische Phenotyp des mutierten MVMp Virus wahrscheinlich in der nicht zu beobachtenden MAPK Phosphorylierung begründet ist.

3.5.2.4 Zelllyse nach MVMp595A/93G Infektion und Zugabe exogener AA

Im vorherigen Kapitel konnte gezeigt werden, dass in der Infektion mit dem hypolytischen MVMp585A/93G Virus im Vergleich zu wildtyp MVMp eine Stimulation von MAPK und somit die Aktivierung von cPLA₂ ausblieb. Basierend auf der Vermutung, dass es sich in der somit nicht erfolgten Freisetzung von AA um eine mögliche Ursache des hypolytischen Phenotypes von MVMp595A/93G handelte, konnte vermutet werden, dass eine exogene Zufuhr von AA zu MVMp585A/93G infizierten Zellen zumindest einen Anstieg in der virusinduzierten Zelllyse bewirken würde.

Zur Untersuchung dieser Vermutung wurden A9 Zellen zunächst mit MVMp585A/93G (MOI 5 / Zelle) infiziert und 12, 24 oder 36 h nach Infektion mit 10 µM AA versetzt. Eine AA Behandlung später als 36 h nach Infektion erschien nicht sinnvoll, da zu diesem Zeitpunkt in einigen Zellen bereits die Lyse einsetzt. Das Ergebnis dieser Analyse ist in Abb. 3-25 dargestellt. Es zeigt, dass eine exogene Zugabe von AA 12 h nach der Infektion keinen Einfluss auf die lytische

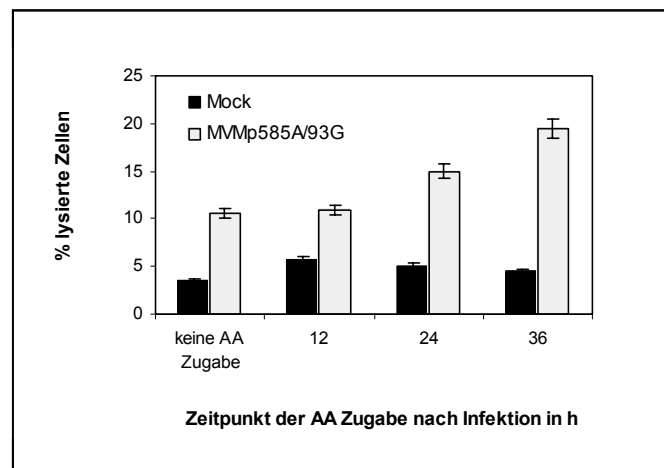


Abb.3-25: MVMp585A/93G induzierte Zelllyse bei exogener Zugabe von AA.

A9 Zellen wurden mit MVMp585A/93G (MOI 5 RU/ml) oder nicht (Mock) infiziert. 12, 24 oder 36h nach der Infektion wurde AA in einer Endkonzentration von 10µM zu den Zellen hinzugegeben. Drei Tage nach der Infektion wurden die Kulturüberstände zur Quantifizierung der Zelllyse im LDH-Assay analysiert (vergleiche Legende zu Abb.3-1). Die dargestellten Werte repräsentieren Mittelwerte aus Triplikaten zweier unabhängiger Versuchsreihen.

Aktivität des Virus hatte. Tatsächlich konnte bei einer AA-Zugabe 24 h nach Infektion bereits ein Anstieg des Anteils lysierter Zellen von 10.9 % auf 15 % beobachtet werden, welcher sich bei Zugabe der AA zu einem noch späteren Zeitpunkt nach Infektion (36 h) bis auf 19.5 % erhöhte. Dies entsprach einer ungefähren Verdopplung des lytischen Effektes von 10.6 % unter normalen Kulturbedingungen. Dieses Ergebnis zeigte, dass die Präsenz von AA in infizierten Zellen einen unterstützenden Einfluss auf die virusinduzierte Zelllyse hatte.

Zusammenfassend lieferte dieses Versuchsergebnis einen weiteren Beweis dafür, dass die der MVMp induzierten Lyse der Wirtszelle vorausgehende Freisetzung von AA kausaler Bestandteil des lytischen Prozesses ist. Es kann davon ausgegangen werden, dass die viralen NS Proteine in diesem Prozess einen regulatorischen Beitrag leisten.

4. Diskussion

Das autonome Parvovirus MVMp ist ein lytisches Virus. Viele Veränderungen, die eine MVMp infizierte Zelle in Metabolismus und Morphologie vor der Lyse durchläuft, sind zum Teil gut erforscht und zumeist als Folgeerscheinung verschiedener Funktionen des viralen NS1 Proteins beschrieben worden. Die grundlegenden Mechanismen der virusinduzierten Zelllyse hingegen, waren bisher gänzlich unklar. Der Fokus der vorliegenden Arbeit lag auf der Untersuchung einer prinzipiellen Beteiligung von Phospholipase A₂ (PLA₂) Enzymen an der virusinduzierten Zelllyse, da diese, neben ihrer essentiellen Funktion in der Produktion von Lipidmediatoren, auch als Effektoren des lytischen Zelltods in Erwägung gezogen werden können. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass PLA₂ Enzyme als wesentliche Faktoren an der MVMp induzierten Zelllyse beteiligt sind.

4.1 Die MVMp induzierte Zelllyse setzt PLA₂ Aktivität voraus

Die Hydrolyse von Phospholipiden durch PLA₂ führt unter anderem zur Freisetzung von Arachidonsäure (AA). Eine Quantifizierung von AA im Kulturüberstand stimulierter Zellen kann somit Aufschluss über eine Aktivierung dieser Enzyme geben.

Die Analyse MVMp infizierter Zellen in der vorliegenden Arbeit ergab, dass korrelierend zur Zelllyse große Mengen AA von den Zellen freigesetzt werden. Dass es sich hierbei nicht um eine Folge der massiven Plasmamembrandegradation handelte, sondern vielmehr um einen enzymatisch regulierten Prozess in der noch intakten Zelle, konnte durch folgende Beobachtungen nachgewiesen werden. Während die Zelllyse, die ab dem zweiten Tag nach der Infektion einer Zellpopulation begann, bis zum dritten Tag weiter stark anstieg, war der Hauptanteil der durch diese Zellpopulation freisetzbaren AA, bereits zwei Tage nach der Infektion im Kulturüberstand nachweisbar (Abb. 3-1). Des Weiteren konnte in infizierten Zellen auch die verstärkte Produktion von PGE₂, einem aus dem AA Metabolismus hervorgehenden Effektormolekül, gezeigt werden (Abb. 3-2). In der weiteren Analyse

der Korrelation von AA-Freisetzung und Zelllyse, konnten durch den Einsatz selektiver PLA₂ Inhibitoren beide Effekte deutlich gehemmt werden (Abb. 3-9 und Abb. 3-10). Diese Beobachtungen lieferten die Hinweise auf eine Beteiligung der PLA₂ in der virusinduzierten AA-Freisetzung und Zelllyse.

Interessanterweise werden PLA₂ Aktivitäten auch im Zusammenhang mit anderen Virusinfektionen beschrieben, wobei die biologische Bedeutung dieser Aktivität für den viralen Infektionszyklus sehr unterschiedlich sein kann.

Beispielsweise führt eine Influenzavirusinfektion des Respirationstraktes über die Aktivierung von cPLA₂ und die Produktion von PGE₂ zur Stimulation des Immunsystems, welche entzündliche Erkrankungen der Atemwege zur Folge hat (Mizumura *et al.*, 2003). Auch die Infektion mit Epstein-Barr Viren (EBV) führt über eine Aktivierung von PLA₂ und die Produktion von Leukotrien B₄ (LTB₄) zur Aktivierung des Immunsystems (Gosselin *et al.*, 2001). Das Humane Cytomegalievirus (HCMV) hingegen schließt während der Reifung von Nachkommenviren zelluläre cPLA₂ in das Virus ein. Diese PLA₂ scheint insbesondere für die Infektivität des Virus relevant zu sein (Allal *et al.*, 2004). Abgesehen von diesen Beispielen, wird, wie in der vorliegenden Arbeit für MVMp, eine PLA₂ Stimulation auch im Zusammenhang mit der Tötung der Wirtszelle durch andere Viren diskutiert. So resultiert etwa die Infektion mit Vesiculostomatitis Viren (VSV) und Semliki Forest Viren in einer PLA₂ vermittelten, erhöhten Permeabilität der Wirtszellmembran (Perez *et al.*, 1993). Ein weiteres Beispiel für den PLA₂ vermittelten, virusinduzierten Zelltod stellen Infektionen mit Dengue Virus (Jan *et al.*, 2000) und Adenovirus (Thorne *et al.*, 1996; Dimitrov *et al.*, 1997) dar. Diese Viren hingegen, induzieren durch die Aktivierung von cPLA₂ nicht den lytischen Tod, sondern die Apoptose der Zelle. Das hier untersuchte Parvovirus MVMp verfügt interessanterweise, wie auch die meisten anderen Parvoviren, im Kapsidprotein VP1 über eine eigene PLA₂. Diese hat einen beachtlichen Einfluss auf die Infektivität des Virus, da sie den Kerntransport der DNA infizierender Viruspartikel bedingt (Zadori *et al.*, 2001; Girod *et al.*, 2002; Vihinen-Ranta *et al.*, 2002; Suikkanen *et al.*, 2003b). Die Untersuchung der Frage ob die parvovirale PLA₂ möglicherweise auch einen Beitrag zur virusinduzierten Zelllyse leisten kann, war Teil der vorliegende Arbeit und wird im letzten Teil des nächsten Kapitels diskutiert.

4.2 Welche PLA₂ sind in die Lyse MVMp infizierter Zellen involviert?

Infolge der Identifikation einer AA-freisetzenden PLA₂ Aktivität im lytischen Prozess der MVMp Infektion, stellte sich die Frage, ob es sich bei dieser um eine zelluläre (sPLA₂, cPLA₂ oder iPLA₂) oder gar um die im VP1 Protein des Virus vorliegende PLA₂ handeln würde.

4.2.1 Zelluläre cPLA₂ in der MVMp induzierten Zellyse

In der Untersuchung MVMp infizierter Zellen konnte zunächst durch den Einsatz selektiver Inhibitoren, später auch durch den eindeutigen Nachweis einer Aktivierung der cPLA₂ gefolgert werden, dass es sich bei diesem zellulären Enzym um einen ganz bedeutenden Schlüsselfaktor in der MVMp induzierten AA-Freisetzung und Zellyse handeln muss.

Ein wichtiges Ereignis in der cPLA₂ Aktivierung ist die Phosphorylierung des Enzyms an definierten Aminosäureresten. Insbesondere die Phosphorylierung an Serinrest 505 steigert die katalytische Aktivität der cPLA₂ um ein vielfaches (Lin *et al.*, 1993; Borsch-Haubold *et al.*, 1998; Qiu *et al.*, 1998). Einige Vertreter der MAPK (Mitogen-aktivierte Proteinkinase) Familie, vor allem die p38 und p44/42 MAPK, sind hierbei von größerer Bedeutung (Nemenoff *et al.*, 1993; Leslie, 1997; Borsch-Haubold, 1998). Wie in dieser Arbeit gezeigt, konnte ca. 24 h nach der MVMp Infektion sowohl eine Stimulation der p38 und p44/42 MAPK als auch die cPLA₂ Phosphorylierung am Serinrest 505 beobachtet werden (Abb. 3-14 und Abb. 3-17).

Die Translokation des Enzyms vom zytosolischen Kompartiment zu intrazellulären Membrankompartimenten, die vor allem perinukleär lokalisiert sind, ist das zweite wesentliche Merkmal der cPLA₂ Aktivierung (Gijon und Leslie, 1999; Evans *et al.*, 2001). Tatsächlich ließ sich, wie in Kapitel 3.4.1. beschrieben, diese intrazelluläre Translokation des Enzyms nach der Infektion mit MVMp feststellen. Die Assoziation des Enzyms mit der Membran wird auch durch seine Interaktion mit zellulären Faktoren reguliert (Murakami *et al.*, 2000). So ist Vimentin, ein Bestandteil des zellulären Intermediärfilamentnetzwerkes, beispielsweise als Interaktionspartner und Translokationsstimulator von cPLA₂ beschrieben (Murakami *et al.*, 2000; Nakatani *et al.*, 2000). Basierend auf der Beobachtung, dass Vimentin nach der MVMp Infektion

perinukleär angereichert wird (Nüesch *et al.*, 2005), kann spekuliert werden, dass dieses zelluläre Zytoskeletprotein auch an der MVMp induzierten Translokation von cPLA₂ beteiligt ist.

Während diese Ergebnisse zweifellos auf eine Funktion der zellulären cPLA₂ im lytischen Prozess der MVMp Infektion hindeuteten, konnte eine Bedeutung zellulärer iPLA₂ ausgeschlossen werden. Dieses Ergebnis war wenig überraschend, da eine iPLA₂ Funktion bisher nur sehr selten in schwerwiegenden Membranveränderungen und der Zelllyse beschrieben ist (Akiba und Sato, 2004).

4.2.2 Zelluläre sPLA₂ in der MVMp induzierten Zelllyse

Während eine Funktion zellulärer cPLA₂ im lytischen Prozess der MVMp Infektion eindeutig nachgewiesen und eine Beteiligung zellulärer iPLAs ausgeschlossen wurde, konnte anhand unterschiedlicher Versuchsansätze eine Funktion zellulärer sPLA₂ in diesem Zusammenhang nicht klargestellt werden. Die Zugabe von 12-epi scalaradial, einem sPLA₂ Inhibitor, hatte einen deutlich hemmenden Einfluss auf die AA-Freisetzung und Lyse infizierter Zellen, was zunächst eine Funktion der sPLA₂ in beiden MVMp vermittelten Effekten annehmen ließ. Wie sich jedoch im Nachhinein herausstellte, ist die Spezifität von 12-epi scalaradial nicht gesichert, da es gegebenenfalls auch eine Reihe anderer Enzyme in der Zelle beeinflussen kann (persönliche Kommunikation, M.Gelb / G.Lambeau). Keinen Effekt hingegen hatte die Verwendung der für zelluläre sPLA₂ hochselektiven Inhibitoren LY311727 und Me-Indoxam. Interessanterweise handelt es sich bei diesen sPLA₂ Inhibitoren um Substanzen, die nicht durch die Plasmamembran gelangen und deshalb intrazellulär aktive sPLA₂ nicht beeinflussen können ((Mounier *et al.*, 2004), persönliche Kommunikation, G.Lambeau). Da außerdem mithilfe unterschiedlicher Versuchsansätze keine sezernierte sPLA₂ im Kulturüberstand infizierter Zellen nachgewiesen wurde, war davon auszugehen, dass es infolge der MVMp Infektion zu keiner sPLA₂ Sekretion kommt. Generell war man bisher davon ausgegangen, dass die Sekretion des Enzyms die Voraussetzung sowohl für intra- als auch extrazellulär aktive sPLA₂ dargestellt (Murakami, 2004). Dies wurde aber kürzlich widerlegt, indem am Beispiel der sPLA₂ Subtypen –IIA und –X gezeigt wurde, dass sie eine AA-freisetzende hydrolytische Aktivität in Säugerzellen schon vor der

Sekretion, intrazellulär haben können (Mounier *et al.*, 2004). Die sPLA₂ Subtypisierung der in dieser Arbeit verwendeten A9 Fibroblasten ergab, dass mindestens fünf (-IB, -IIA, -IIE, -V und -XII-1) der 10 verschiedenen bisher in Säugerzellen identifizierten sPLA₂ Subtypen als mRNA vorliegen. Sollte sich unter Berücksichtigung einer möglichen intrazellulären, hier nicht nachgewiesenen sPLA₂, eine Funktion in der MVMp induzierten AA-Freisetzung und Zelllyse herausstellen, ist es sehr wahrscheinlich, dass diese in engem Zusammenhang mit der durch MVMp aktivierten cPLA₂ steht. Regulatorische Interaktionen dieser Enzyme sind in anderen Säugetiermodellen sowohl für die positive Regulation der cPLA₂ durch sPLA₂ (Hernandez *et al.*, 1998; Kim *et al.*, 2002a; Han *et al.*, 2003), als auch für die positive Regulation der sPLA₂ durch cPLA₂ (Balsinde *et al.*, 1998; Kuwata *et al.*, 1998; Mounier *et al.*, 2004) bereits beschrieben worden. Im Bezug auf die in A9 Zellen exprimierten sPLA₂ Subtypen ist vor allem für sPLA₂-IB und -IIA, auch unabhängig von der enzymatischen Aktivität, von stimulatorischen Interaktionen mit cPLA₂ berichtet worden (Couturier *et al.*, 1999; Kuwata *et al.*, 2000; Murakami und Kudo, 2004b).

Eine hydrolytische Aktivität der sPLA₂ direkt an der äußeren Plasmamembran ist sehr stark davon abhängig, ob das Enzym insbesondere die dort angereicherten Phospholipide binden kann. Von den hier relevanten sPLA₂ ist eine Funktion an der äußeren Plasmamembran für die Subtypen -IB, -IIA und -V bekannt (Murakami und Kudo, 2004a). Würden sPLA₂ eine solche Funktion in der MVMp induzierten Zelllyse haben, hätte das Enzym als Folge der Sekretion im Kulturmedium nachweisbar sein müssen. Dies war nicht der Fall.

In Anbetracht der in dieser Arbeit gezeigten Versuchsergebnisse ist eine Beteiligung zellulärer sPLA₂ an der MVMp induzierten Zelllyse unwahrscheinlich. Derzeit noch nicht verfügbare selektive, sPLA₂ Inhibitoren, welche die Plasmamembran passieren können, sowie subtypspezifische Antisera würden eine weitere Funktionsanalyse der sPLA₂, auch in einer regulatorischen Interaktion mit cPLA₂ möglich machen.

4.2.3 Parvovirale PLA₂ in der MVMp induzierten Zelllyse

Die Untersuchung eines möglichen Beitrags der parvoviralen PLA₂ zur MVMp induzierten AA-Freisetzung und Zelllyse war ein wesentlicher Bestandteil der vorliegenden Arbeit.

Das parvovirale PLA₂ Motiv befindet sich im N-terminalen (VP1nt) Bereich des VP1 Proteins. Aufgrund von Sequenzhomologien vor allem im katalytischen Zentrum wurde diese PLA₂ der Gruppe der zelluläre sPLA₂ untergeordnet (Balsinde *et al.*, 2002). Unterschiedliche Studien zeigten, dass die parvovirale PLA₂ eine essentielle Funktion in der Überführung des viralen Genoms vom Zytoplasma in den Zellkern hat (Zadori *et al.*, 2001; Girod *et al.*, 2002; Suikkanen *et al.*, 2003b). Weitere Details sind hierzu allerdings bisher nicht bekannt.

Mit dem Wissen über diese viruskodierte PLA₂, konnte in dieser Arbeit nach Feststellung der hohen Menge freigesetzter AA infolge einer MVMp Infektion zunächst vermutet werden, dass die AA-Freisetzung eine Folge aus der katalytischen PLA₂ Aktivität eintretender Kapside darstellte. Gegen diese Vermutung sprach allerdings, dass in keinem einzigen Versuch eine Freisetzung von AA unmittelbar nach der Infektion, also vor dem Zeitpunkt von 24 h nach der Infektion, beobachtet werden konnte. Weiterhin ist anzunehmen, dass eine derart massive AA-Freisetzung direkt nach Eintritt des Virus in die Zelle, schwer schädigende Nebenwirkungen hätte und somit das Auslösen der Zelllyse stark beschleunigen würde.

Dass die VP1nt Domäne, welche das PLA₂ Motiv enthält, für die Zelllyse dennoch von enormer Wichtigkeit ist, zeigten Experimente mit rekombinanten MVMp Viren (Kapitel 3.2). Diese wurden produziert, um die gleichzeitige Expression der regulatorischen NS-Proteine und der wildtyp bzw. einer mutierten paroviralen PLA₂ Domäne im VP1nt nach der Infektion zu ermöglichen. Da VP1nt in der Zelle instabil ist (Zadori *et al.*, 2001), kodierte das Transgen in den rekombinanten Viren zur Stabilisation der Domäne für ein VP1nt-EGFP Fusionsprotein, wobei die EGFP Expression gleichzeitig auch die Detektion infizierter Zellen erleichterte. Da zu diesem Zweck die gesamte für die Kapsidproteine kodierende Sequenz durch die entsprechende Transgensequenz ausgetauscht wurde, führte die Infektion mit den rekombinanten Viren zu keiner Nachkommenvirenproduktion. Drei verschiedene rekombinante Viren konnten durch Kotransfektion des rekombinanten Plasmids und eines die Kapsidproteine kodierenden Helferplasmids produziert werden, NS-P4-GFP, NS-P4-VP1ntGFP und NS-P4-mVP1ntGFP. Die Analyse dieser Viren hinsichtlich ihres lytischen Effektes nach der Infektion ergab, dass das ausschließlich die NS Proteine exprimierende Virus NS-P4-GFP weder die Lyse der Wirtszelle noch

die Freisetzung von AA auslöste (Abb. 3-8). Dieses Ergebnis bestätigte die kürzlich publizierte Beobachtung, dass sich für die therapeutische Anwendung entwickelte rekombinante MVMp Vektoren in ihrer lytischen Aktivität sehr stark von der des Wildtypvirus unterscheiden (Lang *et al.*, 2005). Bei dem Transgen in diesen Vektoren handelt es sich um die Sequenz immunstimulatorischer Zytokine, welche, wie im vorliegenden Fall, die Kapsidproteinsequenz ersetzen. Von Lang *et al.* (2005) wird auch diskutiert, dass neben einer Rolle der viralen NS Proteine, eine bisher nicht entdeckte Funktion der Kapsidproteine in der lytischen Aktivität von MVMp von Relevanz sein könnte. Sehr interessant war hier somit die Analyse der rekombinanten NS-P4-VP1ntGFP und NS-P4-mVP1ntGFP Viren. Erstaunlicherweise ergab die Infektion beider Viren eine enorme Steigerung des lytischen Effektes. Die Beobachtung, dass diese beiden rekombinanten Viren auch zu einer Freisetzung von AA nach der Infektion führten, bestätigte auf der einen Seite den direkten Zusammenhang von virusinduzierter AA-Freisetzung und Zelllyse, ließ allerdings auf der anderen Seite auch vermuten, dass die Mutation der parvoviralen PLA₂ in NS-P4-mVP1ntGFP keinen Einfluss auf das lytische Verhalten des Virus hatte. Der formale Beweis, dass die H69G Mutation tatsächlich eine Inaktivierung der viralen PLA₂ Domäne hervorruft, fehlt hier. Dass es sich bei der gewählten Mutation aber mit hoher Wahrscheinlichkeit um eine PLA₂ inaktivierende Veränderung handelte, wurde sowohl in Untersuchungen mit verschiedenen parvoviralen PLA₂ als auch zellulären sPLA₂ Enzymen gezeigt (Zadori *et al.*, 2001; Beck *et al.*, 2003b).

Geht man aber dennoch von einem Beitrag der katalytischen Aktivität der parvoviralen PLA₂ zur lytischen Aktivität des Virus aus, muß zunächst festgestellt werden, ob die virale PLA₂ auch als Domäne neusynthetisierter, frei in der Zelle vorliegender VP1 Proteine katalytisch aktiv sein kann. Erstaunlicherweise variiert die hydrolytische Aktivität der verschiedenen parvoviralen PLA₂ trotz hoher Sequenzidentität sehr stark (Zadori *et al.*, 2001; Canaan *et al.*, 2004). Während beispielsweise die exogene Applikation des rekombinanten VP1nt Proteins des Parvovirus AAV-2 (Adenoassoziiertes Virus-2) auf CHO-K1 Zellen keinen Effekt zeigte, führte die Zugabe von rekombinantem VP1nt Protein des PPV (*porcine parvovirus*) schon nach 2-4 h zur Freisetzung von AA. Aus diesen Beobachtungen kann aber auch gefolgert werden, dass nicht mit dem Kapsid assoziierte parvovirale VP1 Proteine eine PLA₂ Aktivität prinzipiell ausprägen können. Die Möglichkeit einer

PLA₂ Aktivität des VP1 Proteins, unabhängig von den Umgebungsbedingungen im endosomalen Kompartiment, wird auch durch Ergebnisse von *in vitro* Versuchen zur enzymatischen Charakterisierung des PLA₂ Motivs verschiedener Parvoviren gestützt (Zadori *et al.*, 2001; Canaan *et al.*, 2004). Sie ergaben unter anderem, dass das pH Optimum der hydrolytischen Aktivität nicht unbedingt im sauren Bereich, wie im endosomalen Kompartiment zu erwarten wäre, sondern vielmehr bei pH 6 -7 liegt. Darüber hinaus wurde festgestellt, dass die parvovirale PLA₂ große Ähnlichkeiten zur zellulären sPLA₂ vom Subtyp X aufweist, da sie *in vitro* vor allem Phosphatidylcholin mit hoher Spezifität hydrolysiert. Aufgrund dieser Tatsachen kann in Erwägung gezogen werden, dass eine Aktivität der parvoviralen PLA₂ auch an der äußeren, phosphatidylcholinreichen Plasmamembran der Zelle erfolgen könnte.

Auf Grundlage der hier gezeigten Ergebnisse müsste auch im Falle einer Funktion der viralen PLA₂ in der MVMp induzierten Zelllyse davon ausgegangen werden, dass es sich um einen engen regulatorischen Zusammenhang (*cross-talk*) mit der zellulären cPLA₂ handelt. Ob das VP1 Protein in diesem Fall der cPLA₂ Aktivität vor- oder nachgeschaltet ist, wäre zu untersuchen. Ein derartiger regulatorischer *cross-talk* ist, wie bereits zuvor diskutiert, für cPLA₂ und sPLA₂ beschrieben.

Die Daten der vorliegenden Arbeit machen eine zentrale Funktion der katalytischen Aktivität der parvoviralen PLA₂ jedoch unwahrscheinlich, da zum einen die Mutation der katalytischen Aktivität in der viralen PLA₂ keinen Einfluss auf den die Zelllyse unterstützenden Effekt der VP1 N-terminalen Domäne hatte. Zum anderen konnte für sämtliche die MVMp induzierte AA-Freisetzung und Zelllyse hemmende PLA₂ Inhibitoren in dieser Arbeit kein Effekt auf die virale PLA₂ Aktivität nachgewiesen werden, da der Eintritt des Virus in die Zelle sowie die Überführung der viralen DNA in den Zellkern nicht verhindert werden konnte (Abb. 3-11). Allerdings zeigten Canaan *et al.* (2003), dass die Inhibitoren zellulärer PLA₂ erstaunlicherweise auch *in vitro* keinen Effekt auf die enzymatische Aktivität der parvoviralen PLA₂ haben.

Generell muss auf Grundlage der hier gezeigten Ergebnisse festgehalten werden, dass der N-terminale Bereich des VP1 Proteins in MVMp infizierten Zellen maßgeblich zur virusinduzierten Zelllyse beiträgt. Dass dieser Beitrag auf der katalytischen Aktivität der viralen PLA₂ beruht ist unwahrscheinlich, konnte aber nicht ausgeschlossen werden. Man kann davon ausgehen, dass in der Gesamtheit der

hier untersuchten PLA₂ Enzyme, die zelluläre cPLA₂ für den Prozess der MVMp induzierten Zelllyse von zentraler Bedeutung ist.

4.3 Einfluss der viralen NS Proteine auf die MVMp induzierte PLA₂ Aktivität und Zelllyse

Unter den MVMp NS Proteinen ist vor allem für NS1 beschrieben, dass es neben verschiedenen Funktionen im viralen Replikationsablauf auch schädigende Aktivitäten auf die Zelle ausübt (Caillet-Fauquet *et al.*, 1990; Rommelaere und Cornelis, 1991; Legrand *et al.*, 1993; Op De Beeck und Caillet-Fauquet, 1997; Corbau *et al.*, 2000; Op De Beeck *et al.*, 2001; Daeffler *et al.*, 2003). Abgesehen von diesen, wurden aber auch Funktionen des NS2 Proteins, insbesondere in der Interaktion mit NS1, im Zusammenhang mit dem toxischen Effekt des Virus beschrieben (Brandenburger *et al.*, 1990; Legrand *et al.*, 1993).

Die NS Protein vermittelte Toxizität war und ist Gegenstand vieler Untersuchungen, konnte bisher aber nicht mit der Lyse der Zelle in Verbindung gebracht werden.

In der vorliegenden Arbeit sollten unter Verwendung einer MVMp Punktmutante Erkenntnisse über eine mögliche Funktion der NS Proteine in der MVMp induzierten Zelllyse gewonnen werden. Das als hypolytisch charakterisierte Virus (Daeffler *et al.*, 2003), MVMp585A/93G, enthält eine Punktmutation an Aminosäureposition 585 des NS1 Proteins, einer PKC-Konsensus-Phosphorylierungsstelle, die gleichzeitig eine Mutation an Aminosäureposition 93 des NS2 Proteins hervorruft. Während weder die virale Replikation noch die Produktion infektiöser Nachkommenviren beeinträchtigt waren, ergab sich ein verändertes NS1 Phosphorylierungsmuster und ein Verlust der lytischen Aktivität (Daeffler *et al.*, 2003).

Im Vergleich der Infektionen mit wildtyp MVMp Virus oder MVMp585A/93G zeigte sich hier zunächst, dass die Infektion mit dem hypolytischen Virus zu keiner AA-Freisetzung führte (Abb. 3-22). Dies erbrachte einen weiteren Beweis für den engen Zusammenhang von MVMp induzierter PLA₂ Aktivität und Zelllyse. In der weiteren Analyse wurde klar, dass die MVMp585A/93G Infektion auch zu keiner MAPK und Stimulation und der dadurch bedingten cPLA₂ Phosphorylierung führte (Abb. 3-24). Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass die NS Proteine eine wichtige Funktion in der MVMp induzierten Aktivierung der MAPK und PLA₂ Aktivierung haben. Ob es sich bei dieser Funktion um eine direkte oder indirekte

Einflussnahme auf den untersuchten Prozess handelt, bleibt zunächst offen. Es ist außerdem wahrscheinlich, dass diese, wie auch viele andere Funktionen der NS Proteine durch zeitlich differenzierte Phosphorylierungsereignisse reguliert wird.

Untersuchungen an MVMp585A/93G infizierten Zellen erbrachten weiterhin den Beweis, dass die PLA₂ Aktivierung und somit AA-Freisetzung als Voraussetzung für die MVMp induzierte Zelllyse zu betrachten ist. Tatsächlich konnte festgestellt werden, dass die lytische Aktivität MVMp585A/93G durch Zugabe exogener AA von ca. 10 % auf ca. 20 % verdoppelt werden konnte (Abb. 3-25). Allerdings konnte die lytische Aktivität des mutierten Virus allein durch die Zugabe exogener AA nicht bis auf die lytische Aktivität des wildtyp Virus wiederhergestellt werden. Eine Ursache dafür könnte in einem Effekt der Lysophospholipide, dem zweiten Produkt der PLA₂ katalysierten Hydrolyse, begründet sein. Lysophospholipide können als Detergenz die Membranpermeabilität und somit Integrität der Zelle enorm beeinträchtigen (Pompeia *et al.*, 2003). Demnach muß erwogen werden, dass auch Lysophospholipide, für die virusinduzierte Zelllyse von Bedeutung sind. Experimente unter Einbeziehung dieses bioaktiven Produktes der Phospholipidhydrolyse können diesbezüglich Klarheit bringen.

Insgesamt kann auf Grundlage der Daten dieser Arbeit gefolgert werden, dass die viralen NS Proteine als wesentliche Faktoren in der MVMp induzierten Regulation des cPLA₂ assoziierten Netzwerkes und somit der Zelllyse zu betrachten sind. Anhand der vorliegenden Ergebnisse kann allerdings keine genaue Aussage darüber getroffen werden, ob es sich um einen NS1 oder NS2 oder einen durch beide Proteine vermittelten Effekt handelt.

4.4 Mechanismen von PLA₂ Aktivität im Zelltod

Wie hier beschrieben, stellen zelluläre PLA₂ offensichtlich wichtige Schlüsselfaktoren in der MVMp induzierten Zelllyse dar und wurden, wie bereits zuvor erwähnt, auch als Effektoren des Zelltods nach Infektion mit anderen Viren bereits diskutiert. Die Aktivierung von PLA₂ wird jedoch auch unabhängig von einer Virusinfektion sowohl mit dem apototischen als auch lytischen Zelltod in Zusammenhang gebracht.

In der Apoptose ist die Aktivierung der PLA₂ ganz entschieden vom jeweiligen apoptotischen Stimulus abhängig. Während cPLA₂ z.B. in der Fas-induzierten Apoptose in leukämischen Zellen oder HeLa Zellen inaktiviert wird (Adam-Klages *et al.*, 1998; Atsumi *et al.*, 1998; Luschen *et al.*, 1998), wird sie in der TNF α -stimulierten Apoptose durch Caspase-3 Spaltung aktiviert (Wissing *et al.*, 1997; Ilic *et al.*, 1998). Die detaillierte Funktion der aktivierten cPLA₂ im apoptotischen Prozess ist bisher allerdings unklar. Diskutiert wird eine Signalmediator-Funktion von durch cPLA₂ freigesetzter AA.

Unter diesem Aspekt muß bemerkt werden, dass für eine Infektion permissiver Zellen mit dem MVMp verwandten Rattenparvovirus H-1 zwar sowohl der lytische als auch der apoptotische Zelltod beschrieben wurde (Ohshima *et al.*, 1998; Rayet *et al.*, 1998; Ran *et al.*, 1999; Ran *et al.*, 2004), in MVMp infizierten Zellen bisher aber keine pro-apoptotischen Faktoren, wie z.B. TNF- α , oder eine Aktivierung von Caspase-3, 8 oder 9, den Effektoren der Apoptose, festgestellt wurde. Auch die hier vorliegenden Ergebnisse sprechen für die Lyse der Zelle infolge der MVMp Infektion.

Abgesehen von den beschriebenen PLA₂ Funktionen in der Apoptose, kann vor allem auch der nicht-apoptotische, lytische Zelltod mit einer hydrolytischen Aktivität der PLA₂ und somit der massiven Freisetzung von AA in engen Zusammenhang gebracht werden. Verschiedene PLA₂ verursachte Effekte werden hierbei diskutiert. So kann eine langanhaltende PLA₂ Aktivität und die daraus resultierende starke Phospholipidhydrolyse schon *per se* die Integrität der Plasmamembran und somit der gesamten Zelle sehr stark in Mitleidenschaft ziehen (Sevanian *et al.*, 1988). Der Verlust der Integrität intrazellulärer Membranen, wie beispielsweise an denen der Mitochondrien, behindert die Aufrechterhaltung des zellulären Energiehaushaltes schwerwiegend und führt unweigerlich zum Zelltod (Bonventre, 1997). Des Weiteren führen permeabilisierende Veränderungen an der Plasmamembran einerseits zum unkontrollierten Einstrom von Ca²⁺ und anderen Elektrolyten und somit zur Dysregulation intrazellulärer Signalkaskaden (Farooqui *et al.*, 1997; Pompeia *et al.*, 2003). Andererseits kommt es zur Freisetzung zytoplasmatischer Bestandteile, bei denen es sich unter anderem um proteolytische Enzyme handeln kann, die zur Lyse der Zelle beitragen (Bonventre, 1997; Pompeia *et al.*, 2003).

Neben den direkt durch eine starke PLA₂ Aktivität verursachten Membranschäden muss weiterhin bedacht werden, dass die Phospholipidhydrolyse Produkte

hervorbringt, die selbst bioaktive Substanzen darstellen, aber auch als Substrat für die Produktion pro-inflammatorisch aktiver Metabolite, wie Prostaglandinen, Leukotrienen, Thromboxanen und anderen dienen. Hier sind insbesondere Lysophospholipide, neben freien Fettsäuren ein weiteres Produkt der Phospholipidhydrolyse, hoch aktiv und können entweder direkt als Detergens oder durch die Regulation von Ionenkanälen die Membranpermeabilität beeinflussen (Weltzien, 1979; Pompeia *et al.*, 2003; Chemin *et al.*, 2005).

Die vermehrte Produktion freier Fettsäuren stellt die Voraussetzung für Lipidoxidationen. Insbesondere langkettige, mehrfach ungesättigte Fettsäuren, wie AA, sind zytotoxisch (Pompeia *et al.*, 2003), indem sie die Produktion hochreaktiver Radikale stimulieren, welche wiederum die Lipidperoxidation verursachen. Dies hat ganz gravierende Folgen für die Fluidität der Membran und damit Aktivität membranständiger Rezeptoren und Enzyme (Bruch und Thayer, 1983; Sapirstein *et al.*, 1996; Farooqui *et al.*, 1997), sowie für die Integrität der Zellorganellen und die Polarität der Mitochondrienmembran. Auch AA selbst ist sehr anfällig für Oxidationen. Durch die AA Oxidation und dem damit verbundenen Verlust ihrer hydrophoben Eigenschaften wird zur Degradation von Membranen direkt beigetragen (Pompeia *et al.*, 2003).

Diese verschiedenen Mechanismen der PLA₂ Aktivität im lytischen Zelltod machen deutlich, dass die Ursache dieses Todes auch davon abhängig ist, welche der intrazellulären Membranen durch die PLA₂ hydrolysiert wird. Eine genaue Aussage über die Target-Membran der MVMp stimulierten PLA₂ Aktivität kann momentan nicht getroffen werden. Der Nachweis zytoplasmatischer Lactatdehydrogenase (LDH) in Kulturüberständen MVMp infizierter Zellen lässt auf eine Permeabilisierung der Plasmamembran schließen. Die Translokation von cPLA₂ zur Plasmamembran ist zwar im Zusammenhang mit der NADPH Oxidase Aktivierung zur Produktion von Superoxiden in Phagozyten beschrieben worden (Shmelzer *et al.*, 2003), konnte aber infolge einer MVMp Infektion nicht beobachtet werden. Vielmehr wandert das Enzym zu perinukleär lokalisierten Membrankompartimenten, bei welchen es sich, wie in Kapitel 3.4.1 beschrieben, höchstwahrscheinlich um Kompartimente des Endoplasmatischen Retikulums, des Golgiapparates, der Mitochondrien (Fraktion P50), oder kleinen Membranfraktionen wie Vesikeln und Mikrosomen (Fraktion P200) handelt. Die genauere Erkenntnis darüber, an welchen dieser Kompartimente die durch MVMp stimulierte cPLA₂ aktiv ist, wäre für die vollständige Aufklärung des

Mechanismus der MVMP induzierten Zelllyse bedeutsam. Derzeitige Vermutungen weisen in verschiedene Richtungen. Die in Untersuchungen unseres Labors beobachtete Veränderung des mitochondrialen Membranpotenzials infolge der MVMP Infektion lässt spekulieren, dass dieses Zellorganell ein Ziel der MVMP induzierten cPLA₂ Aktivität sein könnte. Hingegen zeigen Untersuchungen an Gliomzellen, die mit dem MVMP-verwandten Rattenparvovirus H1 infiziert wurden, die verstärkte Freisetzung von proteolytischen Cathepsinen aus Lysosomen (persönliche Kommunikation, L.Deleu), was durch eine Aktivität der cPLA₂ an den Membranen dieser Kompartimente erklärt werden könnte. Unter Berücksichtigung der enormen Menge an AA, die nach der MVMP Infektion freigesetzt wird, kann allerdings auch davon ausgegangen werden, dass allein die Produktion dieser freien Fettsäure und der somit anfallenden Lysophospholipide toxische Auswirkungen auf die Zelle haben kann.

4.5 Modell zur Aktivierung zellulärer PLA₂ in der MVMP Infektion

Zelluläre Phospholipase A₂ Enzyme wurde im vorliegenden Projekt als wesentlicher Bestandteil des lytischen Prozesses in MVMP infizierten Zellen identifiziert und soll in Abb. 4-1 zusammenfassend diskutiert werden.

Das schematische Modell, unterteilt in (1) bis (5), fasst basierend auf den hier erzielten Erkenntnissen, den groben zeitlichen Ablauf derjenigen zellulären Prozesse zusammen, welche einen zentralen Beitrag zur MVMP induzierten Zelllyse leisten. Die zeitlich bedingte Expression und Relevanz der NS Proteine und des VP1 Proteins, dessen N-terminale Domäne, sich als sehr bedeutend für die Zelllyse herausstellte, sind veranschaulicht. Im Folgenden werden die Punkte (1) bis (5) besprochen:

(1) Nach der rezeptorvermittelten Endozytose und dem Transport des Viruspartikels in die perinukleäre Region kommt es durch Veränderungen im endosomalen Milieu zur Externalisierung der PLA₂ Domäne des Kapsidproteins VP1. Die PLA₂ Domäne bedingt den Transfer der viralen DNA vom späten Endosom in den Zellkern, führt allerdings zu keiner messbaren AA-Freisetzung, welche hingegen zu einem späteren Zeitpunkt des Infektionszyklus in großer Menge zu beobachten ist.

(2) Die Replikation der viralen DNA erfolgt im Zellkern in strikter Abhängigkeit von Faktoren der zellulären Replikationsmaschinerie. Hierzu wird die einzelsträngige genomische DNA zunächst in eine doppelsträngige Form konvertiert. Die initiale Transaktivierung des P4 Promotors durch zelluläre Faktoren reguliert die Synthese der NS Proteine. Das NS1 Protein übt neben replikativen Funktionen auch toxische Effekte auf die Zelle aus, wie beispielsweise die Dysregulation des Zytoskelettnetzwerkes (im Modell durch unterbrochene Linien dargestellt). Wie in der vorliegenden Arbeit anhand rekombinanter Viren gezeigt, sind diese, durch die NS Proteine vermittelten Effekte für die letztendliche Lyse der Wirtszelle nicht hinreichend.

(3) Als Folge der NS Protein Expression kommt es neben der Transaktivierung zellulärer Promotoren auch zur Aktivierung des viralen P38 Promotors durch das NS1 Protein und somit zur Expression der Strukturproteine. Durch das NS1 Protein wird somit direkt die Menge an VP1 Proteinen in der Zelle reguliert. Sowohl die NS Proteine als auch Kapsidproteine liegen von nun an vorerst frei im Zytoplasma vor. Einen Tag nach der Infektion kann die Aktivierung zellulärer zytosolischer PLA₂ (cPLA₂) beobachtet werden. Dies bedeutet, dass sie von aktivierten p38 und p44/42 MAPK phosphoryliert wird und, durch Ca²⁺-Bindung bedingt, vom Zytosol der Zelle zu intrazellulären, perinukleär angereicherten Membrankompartimenten umlokalisiert. Hierbei kann möglicherweise eine Interaktion der cPLA₂ mit dem Intermediärfilament Vimentin die perinukleäre Lokalisation vermitteln und stabilisieren. Vimentin, so konnte kürzlich gezeigt werden, reorganisiert sich infolge der MVMp Infektion um den Zellkern.

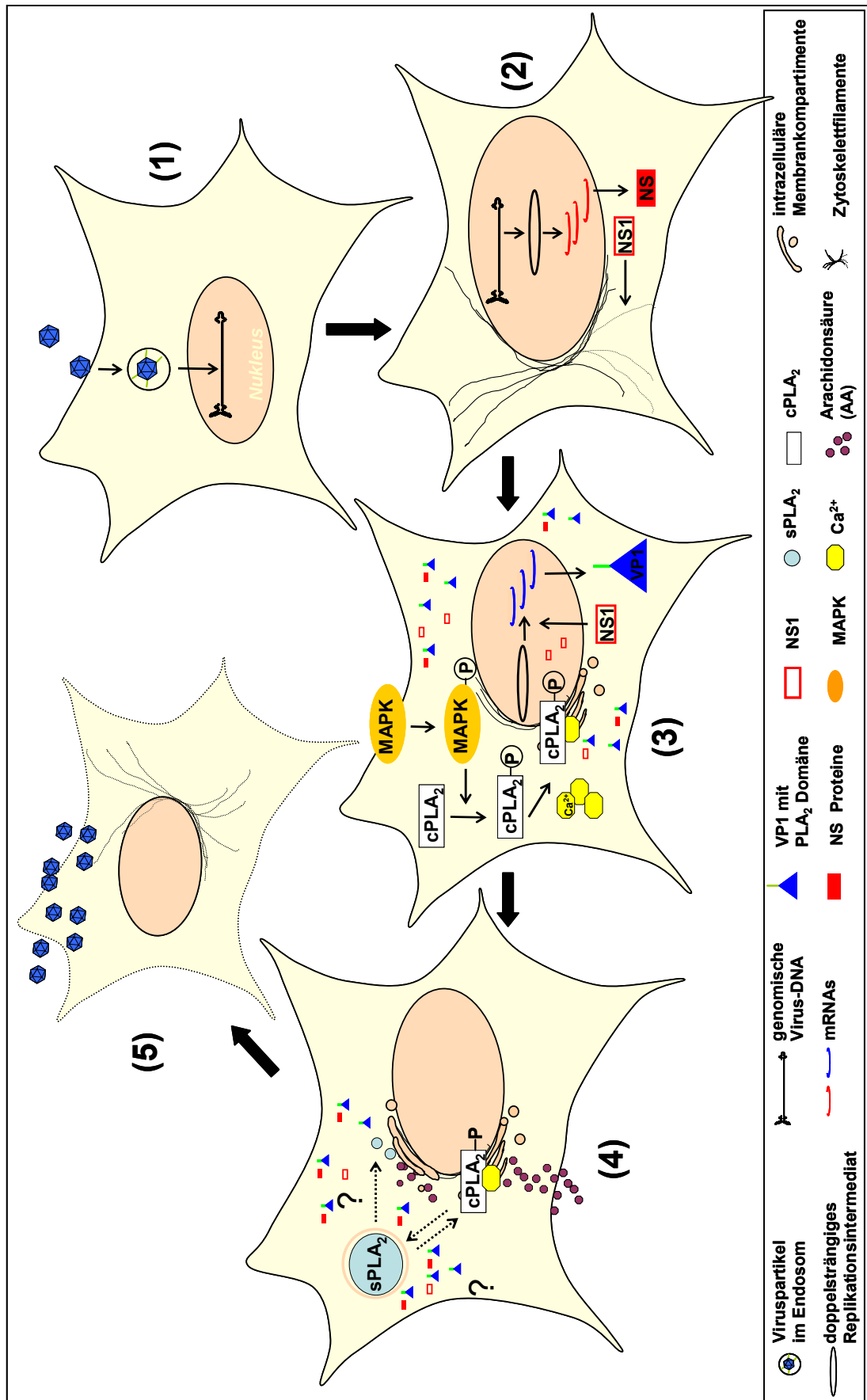
Die hier gezeigten Ergebnisse deuten darauf hin, dass die viralen NS Proteine stimulierend in die cPLA₂ aktivierende Kaskade eingreifen, da die Infektion mit einem in den NS Proteinen mutierten hypolytische MVMp Virus weder die Phosphorylierung der MAPK noch die cPLA₂ Aktivierung bewirkt. Ob es sich um einen direkten oder indirekten NS Protein vermittelten Mechanismus handelt, bleibt vorerst unklar.

(4) Zwei Tage nach der MVMp Infektion ist in den Kulturüberständen MVMp infizierter Zellen eine enorme Menge an AA nachweisbar. Diese kann, wie auch die MVMp induzierte Zelllyse, durch verschiedene Inhibitoren zellulärer PLA₂ vermindert

werden. Sehr wahrscheinlich beruht die hydrolytische Phospholipidspaltung auf der Aktivierung zellulärer cPLA₂. Welche der möglichen intrazellulären, perinukleären Membranen die cPLA₂ zur Phospholipidhydrolyse bindet, ist derzeit unklar. Vor dem Hintergrund der Induktion eines lytischen Prozesses, ist denkbar, dass es sich hierbei um die Mitochondrienmembran oder auch die Membran von Lysosomen handeln könnte. Nach dem jetzigen Kenntnisstand kann auch eine funktionelle Interaktion von cPLA₂ mit intrazellulärer sPLA₂ in der AA-Freisetzung und Zelllyse vermutet werden (in Abb. 4-1 durch unterbrochene Pfeile dargestellt). Obwohl weder die Sekretion der sPLA₂ noch eine Aktivierung eventuell intrazellulär vorliegender sPLA₂ infolge der MVMp Infektion nachweisbar war.

Da sich in Anwesenheit der N-terminalen Domäne des viralen VP1 Proteins die lytische Aktivität eines nicht lytischen rekombinanten Virus stark erhöhte, kann davon ausgegangen werden, dass diese Domäne für den lytischen Prozess von MVMp von entscheidender Relevanz ist. Unwahrscheinlich ist jedoch eine Funktion der katalytischen Aktivität des viralen PLA₂ Motivs, zumindest auf Grundlage hier gezeigter Daten. Es ist vorstellbar, dass frei im Zytoplasma befindliche VP1 Proteine zusammen mit zellulären PLA₂ den lytischen Prozess beeinflussen. Ob VP1 in diesem Zusammenhang eine PLA₂ Aktivität ausprägt oder ob der durch VP1 vermittelte Effekt auf andere Elemente innerhalb seines N-Terminus zurückzuführen ist, bleibt zu erforschen. Eine positive Regulation der angenommenen VP1 Funktion wäre durch die NS1 Transaktivierung des P38 Promotors gewährleistet.

(5) Die unter Kontrolle der viralen Proteine verursachten zellulären Veränderungen, inklusive der Aktivierung der zellulären PLA₂ Kaskade, führen schließlich zur Lyse der Wirtszelle. Im Hinblick auf bekannte PLA₂ Funktionen im lytischen Zelltod, kann die PLA₂ Aktivierung in MVMp infizierten Zellen entweder durch die Plasmamembranhydrolyse *per se*, die Degradation intrazellulärer Membranen und dem damit verbundenen Verlust der Kompartimentierung oder aber durch die Produktion freier AA und Lysophospholipide die Lyse der Zelle bewirken.

Abb.4-1: Modell über die Stimulation zellulärer PLA₂ nach der MVMp Infektion.

4.6 Ausblick

In der vorliegenden Arbeit wurden zelluläre PLA₂ Enzyme als Schlüsselfaktoren der MVMp induzierten Zelllyse identifiziert. Mit dieser wichtigen Entdeckung konnte maßgeblich zum genaueren Verständnis des lytischen Mechanismus von MVMp beigetragen werden.

Die Sensitivität einer Zelle für den MVMp induzierten Tod stellt ein wichtiges Kriterium der onkosuppressiven Eigenschaften des Virus dar. Eine vollständige Aufklärung dieses Prozesses ist demnach vor allem aufgrund der Bestrebungen onkolytische Viren in der Krebstherapie anzuwenden, von großem Interesse.

So ist eine weitere Analyse der detaillierten cPLA₂ Funktion in der MVMp infizierten Wirtszelle für das gänzliche Verständnis des lytischen Mechanismus unerlässlich. Mithilfe zellorganellspezifischer Marker und durch die Etablierung konfokaler Immunfluoreszenzanalysen könnte in Erfahrung gebracht werden, welches der intrazellulären Membrankompartimente der Ort der cPLA₂ vermittelten Phospholipidhydrolyse und AA-Freisetzung ist. Die Aufklärung einer funktionellen Relevanz verschiedener sPLA₂ Subtypen ansich sowie in der Interaktion mit aktivierter cPLA₂ könnte durch *knock-down* Experimente mittels RNAi (*RNA interference*) erfolgen.

Da speziell die Funktion des VP1 Proteins in der MVMp induzierten Zelllyse von wesentlicher Bedeutung zu sein scheint, würden Untersuchungen mit rekombinanten VP1 Proteinen wahrscheinlich einen Schluss zulassen, ob neusynthetisiertes, nicht im Viruskapsid assoziiertes VP1 eine PLA₂ Aktivität in der Zelle ausprägen kann und, wenn ja, eine Mutation des HD Motivs diese inaktiviert. Koimmunpräzipitationen würden die Identifikation von Interaktionspartnern des VP1 Proteins zulassen und somit dessen Regulation, katalytische PLA₂ Aktivität und einen möglichen Zusammenhang mit der Aktivierung zellulärer PLA₂ erklären können.

Von Interesse sollte auch sein, die Schnittstellen des regulatorischen Netzwerkes zu identifizieren, in welche die NS Proteine des Virus eingreifen und festzustellen, ob es sich hierbei um einen NS1 oder NS2 vermittelten Effekt handelt. Für den Fall, dass das VP1 Protein, auch unabhängig von einer katalytischen Aktivität der PLA₂ Domäne, eine zentrale Funktion im lytischen Prozess des Virus hat, sollte aufgedeckt werden, ob die Regulation dieser Funktion ausschließlich auf der Transaktivierung

des P38 Promotors beruht oder ob weitere zwischengeschaltete zelluläre Faktoren hierzu erforderlich sind.

Die detaillierte Aufklärung der Regulation zellulärer PLA₂ durch die parvoviralen NS und VP1 Proteine in der virusinduzierten Zellyse könnte schließlich neue Ansatzpunkte für die Entwicklung therapeutischer Parvoviren liefern. Idealerweise werden diese Viren, die Schlüsseldeterminanten des PLA₂ Aktivierungsnetzwerkes noch effektiver stimulieren als das Wildtypvirus und es somit mit einem erhöhten onkolytischen Potenzial ausstatten.

Ob es sich bei dem beschriebenen und diskutierten Mechanismus der virusinduzierten Zellyse um ein Phänomen handelt, welches vielleicht auch in der Infektion anderer lytischer, vor allem pathogener Viren, beobachtbar ist, bleibt zunächst fraglich. Sollte sich dies bestätigen, würden sich damit neue Möglichkeiten für die Entwicklung geeigneter Wirkstoffe zur Behandlung derartiger Virusinfektionen erschließen.

5. Literatur

- Ackermann, E. J., Conde-Frieboes, K. und Dennis, E. A. (1995).** Inhibition of macrophage Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 by bromoenol lactone and trifluoromethyl ketones. *J Biol Chem* **270**(1): 445-50.
- Adam-Klages, S., Schwandner, R., Luschen, S., Ussat, S., Kreder, D. und Kronke, M. (1998).** Caspase-mediated inhibition of human cytosolic phospholipase A_2 during apoptosis. *J Immunol* **161**(10): 5687-94.
- Agbandje-McKenna, M., Llamas-Saiz, A. L., Wang, F., Tattersall, P. und Rossmann, M. G. (1998).** Functional implications of the structure of the murine parvovirus, minute virus of mice. *Structure* **6**(11): 1369-81.
- Agbandje, M., Parrish, C.R., Rossmann, M.G. (1995).** The structure of parvoviruses. *Sem. Virol.* **6**: 299-309.
- Akiba, S., Ohno, S., Chiba, M., Kume, K., Hayama, M. und Sato, T. (2002).** Protein kinase $\text{C}\alpha$ -dependent increase in Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 in membranes and arachidonic acid liberation in zymosan-stimulated macrophage-like P388D1 cells. *Biochem Pharmacol* **63**(11): 1969-77.
- Akiba, S. und Sato, T. (2004).** Cellular function of calcium-independent phospholipase A_2 . *Biol Pharm Bull* **27**(8): 1174-8.
- Allal, C., Buisson-Brenac, C., Marion, V., Claudel-Renard, C., Faraut, T., Dal Monte, P., Streblow, D., Record, M. und Davignon, J. L. (2004).** Human cytomegalovirus carries a cell-derived phospholipase A_2 required for infectivity. *J Virol* **78**(14): 7717-26.
- Ambudkar, I. S. (2004).** Cellular domains that contribute to Ca^{2+} entry events. *Sci STKE* **2004**(243): pe32.
- Ancian, P., Lambeau, G. und Lazdunski, M. (1995).** Multifunctional activity of the extracellular domain of the M-type (180 kDa) membrane receptor for secretory phospholipases A_2 . *Biochemistry* **34**(40): 13146-51.
- Anouja, F., Wattiez, R., Mousset, S. und Caillet-Fauquet, P. (1997).** The cytotoxicity of the parvovirus minute virus of mice nonstructural protein NS1 is related to changes in the synthesis and phosphorylation of cell proteins. *J Virol* **71**(6): 4671-8.
- Arita, H., Hanasaki, K., Nakano, T., Oka, S., Teraoka, H. und Matsumoto, K. (1991).** Novel proliferative effect of phospholipase A_2 in Swiss 3T3 cells via specific binding site. *J Biol Chem* **266**(29): 19139-41.
- Arnesjo, B., Barrowman, J. und Borgstrom, B. (1967).** The zymogen of phospholipase A_2 in rat pancreatic juice. *Acta Chem Scand* **21**(10): 2897-900.
- Astell, C. R., Thomson, M., Chow, M. B. und Ward, D. C. (1983a).** Structure and replication of minute virus of mice DNA. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* **47 Pt 2**: 751-62.
- Astell, C. R., Thomson, M., Merchlinsky, M. und Ward, D. C. (1983b).** The complete DNA sequence of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *Nucleic Acids Res* **11**(4): 999-1018.
- Atchison, R. W., Casto, B. C. und Hammon, W. M. (1965).** Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**: 754-6.
- Atsumi, G., Murakami, M., Tajima, M., Shimbara, S., Hara, N. und Kudo, I. (1997).** The perturbed membrane of cells undergoing apoptosis is susceptible to type II secretory phospholipase A_2 to liberate arachidonic acid. *Biochim Biophys Acta* **1349**(1): 43-54.

- Atsumi, G., Tajima, M., Hadano, A., Nakatani, Y., Murakami, M. und Kudo, I. (1998).** Fas-induced arachidonic acid release is mediated by Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 but not cytosolic phospholipase A_2 , which undergoes proteolytic inactivation. *J Biol Chem* **273**(22): 13870-7.
- Baek, S. H., Kwon, T. K., Lim, J. H., Lee, Y. J., Chang, H. W., Lee, S. J., Kim, J. H. und Kwun, K. B. (2000).** Secretory phospholipase A_2 -potentiated inducible nitric oxide synthase expression by macrophages requires NF-kappa B activation. *J Immunol* **164**(12): 6359-65.
- Balboa, M. A., Shirai, Y., Gaietta, G., Ellisman, M. H., Balsinde, J. und Dennis, E. A. (2003).** Localization of group V phospholipase A_2 in caveolin-enriched granules in activated P388D1 macrophage-like cells. *J Biol Chem* **278**(48): 48059-65.
- Ball-Goodrich, L. J., Moir, R. D. und Tattersall, P. (1991).** Parvoviral target cell specificity: acquisition of fibrotropism by a mutant of the lymphotropic strain of minute virus of mice involves multiple amino acid substitutions within the capsid. *Virology* **184**(1): 175-86.
- Ball, A., Nielsen, R., Gelb, M. H. und Robinson, B. H. (1999).** Interfacial membrane docking of cytosolic phospholipase A_2 C2 domain using electrostatic potential-modulated spin relaxation magnetic resonance. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(12): 6637-42.
- Balsinde, J., Balboa, M. A. und Dennis, E. A. (1997).** Antisense inhibition of group VI Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 blocks phospholipid fatty acid remodeling in murine P388D1 macrophages. *J Biol Chem* **272**(46): 29317-21.
- Balsinde, J., Balboa, M. A. und Dennis, E. A. (1998).** Functional coupling between secretory phospholipase A_2 and cyclooxygenase-2 and its regulation by cytosolic group IV phospholipase A_2 . *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(14): 7951-6.
- Balsinde, J., Balboa, M. A., Insel, P. A. und Dennis, E. A. (1999).** Regulation and inhibition of phospholipase A_2 . *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **39**: 175-89.
- Balsinde, J. und Dennis, E. A. (1996).** Distinct roles in signal transduction for each of the phospholipase A_2 enzymes present in P388D1 macrophages. *J Biol Chem* **271**(12): 6758-65.
- Balsinde, J. und Dennis, E. A. (1997a).** Function and inhibition of intracellular calcium-independent phospholipase A_2 . *J Biol Chem* **272**(26): 16069-72.
- Balsinde, J. und Dennis, E. A. (1997b).** Function of calcium-independent phospholipase A_2 in arachidonic acid metabolism in P388D1 macrophages. *Adv Exp Med Biol* **407**: 99-103.
- Balsinde, J., Winstead, M. V. und Dennis, E. A. (2002).** Phospholipase A_2 regulation of arachidonic acid mobilization. *FEBS Lett* **531**(1): 2-6.
- Barbour, S. E. und Dennis, E. A. (1993).** Antisense inhibition of group II phospholipase A_2 expression blocks the production of prostaglandin E_2 by P388D1 cells. *J Biol Chem* **268**(29): 21875-82.
- Bashir, T., Horlein, R., Rommelaere, J. und Willwand, K. (2000).** Cyclin A activates the DNA polymerase delta -dependent elongation machinery in vitro: A parvovirus DNA replication model. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(10): 5522-7.
- Bashir, T., Rommelaere, J. und Cziepluch, C. (2001).** In vivo accumulation of cyclin A and cellular replication factors in autonomous parvovirus minute virus of mice-associated replication bodies. *J Virol* **75**(9): 4394-8.
- Beck, G., Yard, B. A., Schulte, J., Haak, M., van Ackern, K., van der Woude, F. J. und Kaszkin, M. (2003a).** Secreted phospholipases A_2 induce the expression of chemokines in microvascular endothelium. *Biochem Biophys Res Commun* **300**(3): 731-7.
- Beck, S., Lambeau, G., Scholz-Pedretti, K., Gelb, M. H., Janssen, M. J., Edwards, S. H., Wilton, D. C., Pfeilschifter, J. und Kaszkin, M. (2003b).** Potentiation of tumor necrosis factor alpha-induced secreted phospholipase A_2 (sPLA $_2$)-IIA expression in mesangial cells by an autocrine loop involving

sPLA₂ and peroxisome proliferator-activated receptor alpha activation. *J Biol Chem* **278**(32): 29799-812.

Berns, K. I. und Linden, R. M. (1995). The cryptic life style of adeno-associated virus. *Bioessays* **17**(3): 237-45.

Berns, K. I., Pinkerton, T. C., Thomas, G. F. und Hoggan, M. D. (1975). Detection of adeno-associated virus (AAV)-specific nucleotide sequences in DNA isolated from latently infected Detroit 6 cells. *Virology* **68**(2): 556-60.

Bezzine, S., Bollinger, J. G., Singer, A. G., Veatch, S. L., Keller, S. L. und Gelb, M. H. (2002). On the binding preference of human groups IIA and X phospholipases A₂ for membranes with anionic phospholipids. *J Biol Chem* **277**(50): 48523-34.

Bezzine, S., Koduri, R. S., Valentin, E., Murakami, M., Kudo, I., Ghomashchi, F., Sadilek, M., Lambeau, G. und Gelb, M. H. (2000). Exogenously added human group X secreted phospholipase A(2) but not the group IB, IIA, and V enzymes efficiently release arachidonic acid from adherent mammalian cells. *J Biol Chem* **275**(5): 3179-91.

Bittova, L., Sumandea, M. und Cho, W. (1999). A structure-function study of the C2 domain of cytosolic phospholipase A₂. Identification of essential calcium ligands and hydrophobic membrane binding residues. *J Biol Chem* **274**(14): 9665-72.

Black, P. H. (1968). The oncogenic DNA viruses: a review of in vitro transformation studies. *Annu Rev Microbiol* **22**: 391-426.

Bleker, S., Sonntag, F. und Kleinschmidt, J. A. (2005). Mutational analysis of narrow pores at the fivefold symmetry axes of adeno-associated virus type 2 capsids reveals a dual role in genome packaging and activation of phospholipase A₂ activity. *J Virol* **79**(4): 2528-40.

Bodendorf, U., Cziepluch, C., Jauniaux, J. C., Rommelaere, J. und Salome, N. (1999). Nuclear export factor CRM1 interacts with nonstructural proteins NS2 from parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **73**(9): 7769-79.

Bonnard, G. D., Manders, E. K., Campbell, D. A., Jr., Herberman, R. B. und Collins, M. J., Jr. (1976). Immunosuppressive activity of a subline of the mouse EL-4 lymphoma. Evidence for minute virus of mice causing the inhibition. *J Exp Med* **143**(1): 187-205.

Bonventre, J. V. (1997). Roles of phospholipases A₂ in brain cell and tissue injury associated with ischemia and excitotoxicity. *J Lipid Mediat Cell Signal* **17**(1): 71-9.

Borsch-Haubold, A. G. (1998). Regulation of cytosolic phospholipase A₂ by phosphorylation. *Biochem Soc Trans* **26**(3): 350-4.

Borsch-Haubold, A. G., Bartoli, F., Asselin, J., Dudler, T., Kramer, R. M., Apitz-Castro, R., Watson, S. P. und Gelb, M. H. (1998). Identification of the phosphorylation sites of cytosolic phospholipase A₂ in agonist-stimulated human platelets and HeLa cells. *J Biol Chem* **273**(8): 4449-58.

Bradford, M. M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248-54.

Brandenburger, A., Legendre, D., Avalosse, B. und Rommelaere, J. (1990). NS-1 and NS-2 proteins may act synergistically in the cytopathogenicity of parvovirus MVMp. *Virology* **174**(2): 576-84.

Brockhaus, K., Plaza, S., Pintel, D. J., Rommelaere, J. und Salome, N. (1996). Nonstructural proteins NS2 of minute virus of mice associate in vivo with 14-3-3 protein family members. *J Virol* **70**(11): 7527-34.

Brown, K. E., Anderson, S. M. und Young, N. S. (1993). Erythrocyte P antigen: cellular receptor for B19 parvovirus. *Science* **262**(5130): 114-7.

- Brownstein, D. G., Smith, A. L., Johnson, E. A., Pintel, D. J., Naeger, L. K. und Tattersall, P. (1992).** The pathogenesis of infection with minute virus of mice depends on expression of the small nonstructural protein NS2 and on the genotype of the allotropic determinants VP1 and VP2. *J Virol* **66**(5): 3118-24.
- Bruch, R. C. und Thayer, W. S. (1983).** Differential effect of lipid peroxidation on membrane fluidity as determined by electron spin resonance probes. *Biochim Biophys Acta* **733**(2): 216-22.
- Buckland, A. G. und Wilton, D. C. (2000).** The antibacterial properties of secreted phospholipases A(2). *Biochim Biophys Acta* **1488**(1-2): 71-82.
- Bunt, G., de Wit, J., van den Bosch, H., Verkleij, A. J. und Boonstra, J. (1997).** Ultrastructural localization of cPLA₂ in unstimulated and EGF/A23187-stimulated fibroblasts. *J Cell Sci* **110** (Pt 19): 2449-59.
- Caillet-Fauquet, P., Perros, M., Brandenburger, A., Spegelaere, P. und Rommelaere, J. (1990).** Programmed killing of human cells by means of an inducible clone of parvoviral genes encoding non-structural proteins. *Embo J* **9**(9): 2989-95.
- Canaan, S., Zadori, Z., Ghomashchi, F., Bollinger, J., Sadilek, M., Moreau, M. E., Tijssen, P. und Gelb, M. H. (2004).** Interfacial enzymology of parvovirus phospholipases A₂. *J Biol Chem* **279**(15): 14502-8.
- Capper, E. A. und Marshall, L. A. (2001).** Mammalian phospholipases A(2): mediators of inflammation, proliferation and apoptosis. *Prog Lipid Res* **40**(3): 167-97.
- Cater, J. E. und Pintel, D. J. (1992).** The small non-structural protein NS2 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is required for virus growth in murine cells. *J Gen Virol* **73** (Pt 7): 1839-43.
- Chakraborti, S. (2003).** Phospholipase A(2) isoforms: a perspective. *Cell Signal* **15**(7): 637-65.
- Chemin, J., Patel, A., Duprat, F., Zanzouri, M., Lazdunski, M. und Honore, E. (2005).** Lysophosphatidic acid-operated K⁺ channels. *J Biol Chem* **280**(6): 4415-21.
- Chen, Y. Q., de Foresta, F., Hertoghs, J., Avalosse, B. L., Cornelis, J. J. und Rommelaere, J. (1986).** Selective killing of simian virus 40-transformed human fibroblasts by parvovirus H-1. *Cancer Res* **46**(7): 3574-9.
- Chiocca, E. A. (2002).** Oncolytic viruses. *Nat Rev Cancer* **2**(12): 938-50.
- Christensen, J., Cotmore, S. F. und 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. *J Virol* **69**(9): 5422-30.
- Clark, J. D., Schievella, A. R., Nalefski, E. A. und Lin, L. L. (1995).** Cytosolic phospholipase A₂. *J Lipid Mediat Cell Signal* **12**(2-3): 83-117.
- Clemens, K. E. und Pintel, D. (1987).** Minute virus of mice (MVM) mRNAs predominantly polyadenylate at a single site. *Virology* **160**(2): 511-4.
- Coffey, M. C., Strong, J. E., Forsyth, P. A. und Lee, P. W. (1998).** Reovirus therapy of tumors with activated Ras pathway. *Science* **282**(5392): 1332-4.
- Corbau, R., Duverger, V., Rommelaere, J. und Nüesch, J. P. (2000).** Regulation of MVM NS1 by protein kinase C: impact of mutagenesis at consensus phosphorylation sites on replicative functions and cytopathic effects. *Virology* **278**(1): 151-67.
- Corbau, R., Salom, N., Rommelaere, J. und Nüesch, J. P. (1999).** Phosphorylation of the viral nonstructural protein NS1 during MVMp infection of A9 cells. *Virology* **259**(2): 402-15.

Cornelis, J. J., Becquart, P., Duponchel, N., Salome, N., Avalosse, B. L., Namba, M. und Rommelaere, J. (1988a). Transformation of human fibroblasts by ionizing radiation, a chemical carcinogen, or simian virus 40 correlates with an increase in susceptibility to the autonomous parvoviruses H-1 virus and minute virus of mice. *J Virol* **62**(5): 1679-86.

Cornelis, J. J., Chen, Y. Q., Spruyt, N., Duponchel, N., Cotmore, S. F., Tattersall, P. und Rommelaere, J. (1990). Susceptibility of human cells to killing by the parvoviruses H-1 and minute virus of mice correlates with viral transcription. *J Virol* **64**(6): 2537-44.

Cornelis, J. J., Salome, N., Dinsart, C. und Rommelaere, J. (2004). Vectors based on autonomous parvoviruses: novel tools to treat cancer? *J Gene Med* **6 Suppl 1**: S193-202.

Cornelis, J. J., Spruyt, N., Spegelaere, P., Guetta, E., Darawshi, T., Cotmore, S. F., Tal, J. und Rommelaere, J. (1988b). Sensitization of transformed rat fibroblasts to killing by parvovirus minute virus of mice correlates with an increase in viral gene expression. *J Virol* **62**(9): 3438-44.

Cotmore, S. F., D'Abramo, A. M., Jr., Ticknor, C. M. und Tattersall, P. (1999). Controlled conformational transitions in the MVM virion expose the VP1 N-terminus and viral genome without particle disassembly. *Virology* **254**(1): 169-81.

Cotmore, S. F., D'Abramo, A. M., Jr., Carbonell, L. F., Bratton, J. und Tattersall, P. (1997). The NS2 polypeptide of parvovirus MVM is required for capsid assembly in murine cells. *Virology* **231**(2): 267-80.

Cotmore, S. F., Nüesch, J. P. und Tattersall, P. (1992). In vitro excision and replication of 5' telomeres of minute virus of mice DNA from cloned palindromic concatemer junctions. *Virology* **190**(1): 365-77.

Cotmore, S. F. und Tattersall, P. (1986a). The NS-1 polypeptide of the autonomous parvovirus MVM is a nuclear phosphoprotein. *Virus Res* **4**(3): 243-50.

Cotmore, S. F. und Tattersall, P. (1986b). Organization of nonstructural genes of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **58**(3): 724-32.

Cotmore, S. F. und Tattersall, P. (1987). The autonomously replication parvoviruses of vertebrates. *Adv. Virus Res.* **33**: 91-174.

Cotmore, S. F. und Tattersall, P. (1989). A genome-linked copy of the NS-1 polypeptide is located on the outside of infectious parvovirus particles. *J Virol* **63**(9): 3902-11.

Cotmore, S. F. und Tattersall, P. (1990). Alternate splicing in a parvoviral nonstructural gene links a common amino-terminal sequence to downstream domains which confer radically different localization and turnover characteristics. *Virology* **177**(2): 477-87.

Cotmore, S. F. a. T., P. (1995). DNA replication in the autonomous parvoviruses. *Seminars in Virology* **6**: 271-281.

Couturier, C., Brouillet, A., Couriaud, C., Koumanov, K., Bereziat, G. und Andreani, M. (1999). Interleukin 1beta induces type II-secreted phospholipase A(2) gene in vascular smooth muscle cells by a nuclear factor kappaB and peroxisome proliferator-activated receptor-mediated process. *J Biol Chem* **274**(33): 23085-93.

Crawford, L. V. (1966). A minute virus of mice. *Virology* **29**(4): 605-12.

Cummings, B. S., McHowat, J. und Schnellmann, R. G. (2000). Phospholipase A(2)s in cell injury and death. *J Pharmacol Exp Ther* **294**(3): 793-9.

Cziepluch, C., Lampel, S., Grewenig, A., Grund, C., Lichter, P. und Rommelaere, J. (2000). H-1 parvovirus-associated replication bodies: a distinct virus-induced nuclear structure. *J Virol* **74**(10): 4807-15.

- Daeffler, L., Horlein, R., Rommelaere, J. und Nüesch, J. P. (2003).** Modulation of minute virus of mice cytotoxic activities through site-directed mutagenesis within the NS coding region. *J Virol* **77**(23): 12466-78.
- Davletov, B., Perisic, O. und Williams, R. L. (1998).** Calcium-dependent membrane penetration is a hallmark of the C2 domain of cytosolic phospholipase A₂ whereas the C2A domain of synaptotagmin binds membranes electrostatically. *J Biol Chem* **273**(30): 19093-6.
- Deleu, L., Fuks, F., Spitkovsky, D., Horlein, R., Faisst, S. und Rommelaere, J. (1998).** Opposite transcriptional effects of cyclic AMP-responsive elements in confluent or p27KIP-overexpressing cells versus serum-starved or growing cells. *Mol Cell Biol* **18**(1): 409-19.
- Deleu, L., Pujol, A., Faisst, S. und Rommelaere, J. (1999).** Activation of promoter P4 of the autonomous parvovirus minute virus of mice at early S phase is required for productive infection. *J Virol* **73**(5): 3877-85.
- Dennis, E. A. (1994).** Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A₂. *J Biol Chem* **269**(18): 13057-60.
- Dennis, E. A. (1997).** The growing phospholipase A₂ superfamily of signal transduction enzymes. *Trends Biochem Sci* **22**(1): 1-2.
- Dettwiler, S., Rommelaere, J. und Nüesch, J. P. (1999).** DNA unwinding functions of minute virus of mice NS1 protein are modulated specifically by the lambda isoform of protein kinase C. *J Virol* **73**(9): 7410-20.
- Di Pasquale, G., Davidson, B. L., Stein, C. S., Martins, I., Scudiero, D., Monks, A. und Chiorini, J. A. (2003).** Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* **9**(10): 1306-12.
- Dignam, J. D., Lebovitz, R. M. und Roeder, R. G. (1983).** Accurate transcription initiation by RNA polymerase II in a soluble extract from isolated mammalian nuclei. *Nucleic Acids Res* **11**(5): 1475-89.
- Dimitrov, T., Krajcsi, P., Hermiston, T. W., Tollefson, A. E., Hannink, M. und Wold, W. S. (1997).** Adenovirus E3-10.4K/14.5K protein complex inhibits tumor necrosis factor-induced translocation of cytosolic phospholipase A₂ to membranes. *J Virol* **71**(4): 2830-7.
- Dorsch, S., Liebisch, G., Kaufmann, B., von Landenberg, P., Hoffmann, J. H., Drobnik, W. und Modrow, S. (2002).** The VP1 unique region of parvovirus B19 and its constituent phospholipase A₂-like activity. *J Virol* **76**(4): 2014-8.
- Dupressoir, T., Vanacker, J. M., Cornelis, J. J., Duponchel, N. und Rommelaere, J. (1989).** Inhibition by parvovirus H-1 of the formation of tumors in nude mice and colonies in vitro by transformed human mammary epithelial cells. *Cancer Res* **49**(12): 3203-8.
- Eichwald, V., Daeffler, L., Klein, M., Rommelaere, J. und Salome, N. (2002).** The NS2 proteins of parvovirus minute virus of mice are required for efficient nuclear egress of progeny virions in mouse cells. *J Virol* **76**(20): 10307-19.
- El Bakkouri, K., Servais, C., Clement, N., Cheong, S. C., Franssen, J. D., Velu, T. und Brandenburger, A. (2005).** In vivo anti-tumour activity of recombinant MVM parvoviral vectors carrying the human interleukin-2 cDNA. *J Gene Med* **7**(2): 189-97.
- El Bakkouri K., N. C., T. Velu, A. Brandenburger (2000).** Anti-tumor activity of recombinant parvovirus MVM/ILs in immunocompetent mice. *8th Parvovirus Workshop*, Mont-Tremblant, Canada.
- Evans, J. H., Gerber, S. H., Murray, D. und Leslie, C. C. (2004).** The calcium binding loops of the cytosolic phospholipase A₂ C2 domain specify targeting to Golgi and ER in live cells. *Mol Biol Cell* **15**(1): 371-83.
- Evans, J. H. und Leslie, C. C. (2004).** The cytosolic phospholipase A₂ catalytic domain modulates association and residence time at Golgi membranes. *J Biol Chem* **279**(7): 6005-16.

- Evans, J. H., Spencer, D. M., Zweifach, A. und Leslie, C. C. (2001).** Intracellular calcium signals regulating cytosolic phospholipase A₂ translocation to internal membranes. *J Biol Chem* **276**(32): 30150-60.
- Everts, B. und van der Poel, H. G. (2005).** Replication-selective oncolytic viruses in the treatment of cancer. *Cancer Gene Ther* **12**(2): 141-61.
- Faisst, S., Guittard, D., Benner, A., Cesbron, J. Y., Schlehofer, J. R., Rommelaere, J. und Dupressoir, T. (1998).** Dose-dependent regression of HeLa cell-derived tumours in SCID mice after parvovirus H-1 infection. *Int J Cancer* **75**(4): 584-9.
- Faisst, S., Perros, M., Deleu, L., Spruyt, N. und Rommelaere, J. (1994).** Mapping of upstream regulatory elements in the P4 promoter of parvovirus minute virus of mice. *Virology* **202**(1): 466-70.
- Faisst, S. R., Faisst, S., Grangette, C., Schlehofer, J. R. und Rommelaere, J. (1993).** NF kappa B upstream regulatory sequences of the HIV-1 LTR are involved in the inhibition of HIV-1 promoter activity by the NS proteins of autonomous parvoviruses H-1 and MVMp. *Virology* **197**(2): 770-3.
- Farooqui, A. A., Ong, W. Y. und Horrocks, L. A. (2004).** Biochemical aspects of neurodegeneration in human brain: involvement of neural membrane phospholipids and phospholipases A₂. *Neurochem Res* **29**(11): 1961-77.
- Farooqui, A. A., Yang, H. C. und Horrocks, L. (1997).** Involvement of phospholipase A₂ in neurodegeneration. *Neurochem Int* **30**(6): 517-22.
- Fayard, J. M., Tessier, C., Pageaux, J. F., Lagarde, M. und Laugier, C. (1998).** Nuclear location of PLA₂-I in proliferative cells. *J Cell Sci* **111** (Pt 7): 985-94.
- Feldherr, C. M., Kallenbach, E. und Schultz, N. (1984).** Movement of a karyophilic protein through the nuclear pores of oocytes. *J Cell Biol* **99**(6): 2216-22.
- Fonteh, A. N., Marion, C. R., Barham, B. J., Edens, M. B., Atsumi, G., Samet, J. M., High, K. P. und Chilton, F. H. (2001).** Enhancement of mast cell survival: a novel function of some secretory phospholipase A(2) isotypes. *J Immunol* **167**(8): 4161-71.
- Fu, Y., Ishii, K. K., Munakata, Y., Saitoh, T., Kaku, M. und Sasaki, T. (2002).** Regulation of tumor necrosis factor alpha promoter by human parvovirus B19 NS1 through activation of AP-1 and AP-2. *J Virol* **76**(11): 5395-403.
- Fuks, F., Deleu, L., Dinsart, C., Rommelaere, J. und Faisst, S. (1996).** ras oncogene-dependent activation of the P4 promoter of minute virus of mice through a proximal P4 element interacting with the Ets family of transcription factors. *J Virol* **70**(3): 1331-9.
- Gambero, A., Thomazzi, S. M., Cintra, A. C., Landucci, E. C., De Nucci, G. und Antunes, E. (2004).** Signalling pathways regulating human neutrophil migration induced by secretory phospholipases A₂. *Toxicon* **44**(5): 473-81.
- Gardiner, E. M. und Tattersall, P. (1988).** Evidence that developmentally regulated control of gene expression by a parvoviral allotropic determinant is particle mediated. *J Virol* **62**(5): 1713-22.
- Gelb, M. H., Jain, M. K., Hanel, A. M. und Berg, O. G. (1995).** Interfacial enzymology of glycerolipid hydrolases: lessons from secreted phospholipases A₂. *Annu Rev Biochem* **64**: 653-88.
- Gerber, S. H., Rizo, J. und Sudhof, T. C. (2001).** The top loops of the C(2) domains from synaptotagmin and phospholipase A(2) control functional specificity. *J Biol Chem* **276**(34): 32288-92.
- Ghomashchi, F., Lin, Y., Hixon, M. S., Yu, B. Z., Annand, R., Jain, M. K. und Gelb, M. H. (1998).** Interfacial recognition by bee venom phospholipase A₂: insights into nonelectrostatic molecular determinants by charge reversal mutagenesis. *Biochemistry* **37**(19): 6697-710.

- Ghomashchi, F., Stewart, A., Hefner, Y., Ramanadham, S., Turk, J., Leslie, C. C. und Gelb, M. H. (2001). A pyrrolidine-based specific inhibitor of cytosolic phospholipase A₂α blocks arachidonic acid release in a variety of mammalian cells. *Biochim Biophys Acta* **1513**(2): 160-6.
- Giese, N. A., Raykov, Z., DeMartino, L., Vecchi, A., Sozzani, S., Dinsart, C., Cornelis, J. J. und Rommelaere, J. (2002). Suppression of metastatic hemangiosarcoma by a parvovirus MVMP vector transducing the IP-10 chemokine into immunocompetent mice. *Cancer Gene Ther* **9**(5): 432-42.
- Gijon, M. A. und Leslie, C. C. (1999). Regulation of arachidonic acid release and cytosolic phospholipase A₂ activation. *J Leukoc Biol* **65**(3): 330-6.
- Gijon, M. A., Spencer, D. M., Kaiser, A. L. und Leslie, C. C. (1999). Role of phosphorylation sites and the C2 domain in regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J Cell Biol* **145**(6): 1219-32.
- Gijon, M. A., Spencer, D. M. und Leslie, C. C. (2000). Recent advances in the regulation of cytosolic phospholipase A₂. *Adv Enzyme Regul* **40**: 255-68.
- Girod, A., Wobus, C. E., Zadori, Z., Ried, M., Leike, K., Tijssen, P., Kleinschmidt, J. A. und Hallek, M. (2002). The VP1 capsid protein of adeno-associated virus type 2 is carrying a phospholipase A₂ domain required for virus infectivity. *J Gen Virol* **83**(Pt 5): 973-8.
- Glover, S., de Carvalho, M. S., Bayburt, T., Jonas, M., Chi, E., Leslie, C. C. und Gelb, M. H. (1995). Translocation of the 85-kDa phospholipase A₂ from cytosol to the nuclear envelope in rat basophilic leukemia cells stimulated with calcium ionophore or IgE/antigen. *J Biol Chem* **270**(25): 15359-67.
- Goncalves, J., Jallepalli, P. und Gabuzda, D. H. (1994). Subcellular localization of the Vif protein of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **68**(2): 704-12.
- Gosselin, J., Savard, M., Tardif, M., Flamand, L. und Borgeat, P. (2001). Epstein-Barr virus primes human polymorphonuclear leucocytes for the biosynthesis of leukotriene B₄. *Clin Exp Immunol* **126**(3): 494-502.
- Granata, F., Balestrieri, B., Petraroli, A., Giannattasio, G., Marone, G. und Triggiani, M. (2003). Secretory phospholipases A₂ as multivalent mediators of inflammatory and allergic disorders. *Int Arch Allergy Immunol* **131**(3): 153-63.
- Granata, F., Petraroli, A., Boilard, E., Bezzine, S., Bollinger, J., Del Vecchio, L., Gelb, M. H., Lambeau, G., Marone, G. und Triggiani, M. (2005). Activation of cytokine production by secreted phospholipase A₂ in human lung macrophages expressing the M-type receptor. *J Immunol* **174**(1): 464-74.
- Guetta, E., Graziani, Y. und Tal, J. (1986). Suppression of Ehrlich ascites tumors in mice by minute virus of mice. *J Natl Cancer Inst* **76**(6): 1177-80.
- Haag, A., Menten, P., Van Damme, J., Dinsart, C., Rommelaere, J. und Cornelis, J. J. (2000). Highly efficient transduction and expression of cytokine genes in human tumor cells by means of autonomous parvovirus vectors; generation of antitumor responses in recipient mice. *Hum Gene Ther* **11**(4): 597-609.
- Haas, U., Podda, M., Behne, M., Gurrieri, S., Alonso, A., Furstenberger, G., Pfeilschifter, J., Lambeau, G., Gelb, M. H. und Kaszkin, M. (2005). Characterization and differentiation-dependent regulation of secreted phospholipases A in human keratinocytes and in healthy and psoriatic human skin. *J Invest Dermatol* **124**(1): 204-11.
- Hagishita, S., Yamada, M., Shirahase, K., Okada, T., Murakami, Y., Ito, Y., Matsuura, T., Wada, M., Kato, T., Ueno, M., Chikazawa, Y., Yamada, K., Ono, T., Teshirogi, I. und Ohtani, M. (1996). Potent inhibitors of secretory phospholipase A₂: synthesis and inhibitory activities of indolizine and indene derivatives. *J Med Chem* **39**(19): 3636-58.
- Han, W. K., Sapirstein, A., Hung, C. C., Alessandrini, A. und Bonventre, J. V. (2003). Cross-talk between cytosolic phospholipase A₂ α (cPLA₂ α) and secretory phospholipase A₂ (sPLA₂) in

hydrogen peroxide-induced arachidonic acid release in murine mesangial cells: sPLA₂ regulates cPLA₂ alpha activity that is responsible for arachidonic acid release. *J Biol Chem* **278**(26): 24153-63.

Hanasaki, K. und Arita, H. (1992). Characterization of a high affinity binding site for pancreatic-type phospholipase A₂ in the rat. Its cellular and tissue distribution. *J Biol Chem* **267**(9): 6414-20.

Hanasaki, K. und Arita, H. (1999). Biological and pathological functions of phospholipase A(2) receptor. *Arch Biochem Biophys* **372**(2): 215-23.

Hanasaki, K., Ono, T., Saiga, A., Morioka, Y., Ikeda, M., Kawamoto, K., Higashino, K., Nakano, K., Yamada, K., Ishizaki, J. und Arita, H. (1999). Purified group X secretory phospholipase A(2) induced prominent release of arachidonic acid from human myeloid leukemia cells. *J Biol Chem* **274**(48): 34203-11.

Hardt, N., Dinsart, C., Spadari, S., Pedrali-Noy, G. und Rommelaere, J. (1983). Interrelation between viral and cellular DNA synthesis in mouse cells infected with the parvovirus minute virus of mice. *J Gen Virol* **64 (Pt 9)**: 1991-8.

Hermonat, P. L., Labow, M. A., Wright, R., Berns, K. I. und Muzyczka, N. (1984). Genetics of adeno-associated virus: isolation and preliminary characterization of adeno-associated virus type 2 mutants. *J Virol* **51**(2): 329-39.

Hernandez, M., Burillo, S. L., Crespo, M. S. und Nieto, M. L. (1998). Secretory phospholipase A₂ activates the cascade of mitogen-activated protein kinases and cytosolic phospholipase A₂ in the human astrocytoma cell line 1321N1. *J Biol Chem* **273**(1): 606-12.

Herrero, Y. C. M., Cornelis, J. J., Herold-Mende, C., Rommelaere, J., Schlehofer, J. R. und Geletneky, K. (2004). Parvovirus H-1 infection of human glioma cells leads to complete viral replication and efficient cell killing. *Int J Cancer* **109**(1): 76-84.

Hirabayashi, T., Murayama, T. und Shimizu, T. (2004). Regulatory mechanism and physiological role of cytosolic phospholipase A₂. *Biol Pharm Bull* **27**(8): 1168-73.

Hirt, B. (1967). Selective extraction of polyoma DNA from infected mouse cell cultures. *J Mol Biol* **26**(2): 365-9.

Hoggan, M. D., Blacklow, N. R. und Rowe, W. P. (1966). Studies of small DNA viruses found in various adenovirus preparations: physical, biological, and immunological characteristics. *Proc Natl Acad Sci U S A* **55**(6): 1467-74.

Huwiler, A., Staudt, G., Kramer, R. M. und Pfeilschifter, J. (1997). Cross-talk between secretory phospholipase A₂ and cytosolic phospholipase A₂ in rat renal mesangial cells. *Biochim Biophys Acta* **1348**(3): 257-72.

Ilic, D., Almeida, E. A., Schlaepfer, D. D., Dazin, P., Aizawa, S. und Damsky, C. H. (1998). Extracellular matrix survival signals transduced by focal adhesion kinase suppress p53-mediated apoptosis. *J Cell Biol* **143**(2): 547-60.

Jacoby, R. O., Ball-Goodrich, L. J., Besselsen, D. G., McKisic, M. D., Riley, L. K. und Smith, A. L. (1996). Rodent parvovirus infections. *Lab Anim Sci* **46**(4): 370-80.

Jan, J. T., Chen, B. H., Ma, S. H., Liu, C. I., Tsai, H. P., Wu, H. C., Jiang, S. Y., Yang, K. D. und Shaio, M. F. (2000). Potential dengue virus-triggered apoptotic pathway in human neuroblastoma cells: arachidonic acid, superoxide anion, and NF-kappaB are sequentially involved. *J Virol* **74**(18): 8680-91.

Jenkins, C. M., Wolf, M. J., Mancuso, D. J. und Gross, R. W. (2001). Identification of the calmodulin-binding domain of recombinant calcium-independent phospholipase A₂beta. implications for structure and function. *J Biol Chem* **276**(10): 7129-35.

Jongeneel, C. V., Sahli, R., McMaster, G. K. und Hirt, B. (1986). A precise map of splice junctions in the mRNAs of minute virus of mice, an autonomous parvovirus. *J Virol* **59**(3): 564-73.

- Kaludov, N., Brown, K. E., Walters, R. W., Zabner, J. und Chiorini, J. A. (2001).** Adeno-associated virus serotype 4 (AAV4) and AAV5 both require sialic acid binding for hemagglutination and efficient transduction but differ in sialic acid linkage specificity. *J Virol* **75**(15): 6884-93.
- Kestler, J., Neeb, B., Struyf, S., Van Damme, J., Cotmore, S. F., D'Abramo, A., Tattersall, P., Rommelaere, J., Dinsart, C. und Cornelis, J. J. (1999).** cis requirements for the efficient production of recombinant DNA vectors based on autonomous parvoviruses. *Hum Gene Ther* **10**(10): 1619-32.
- Kilham, L. und Olivier, L. J. (1959).** A latent virus of rats isolated in tissue culture. *Virology* **7**(4): 428-37.
- Kim, K. P., Rafter, J. D., Bittova, L., Han, S. K., Snitko, Y., Munoz, N. M., Leff, A. R. und Cho, W. (2001).** Mechanism of human group V phospholipase A₂ (PLA₂)-induced leukotriene biosynthesis in human neutrophils. A potential role of heparan sulfate binding in PLA₂ internalization and degradation. *J Biol Chem* **276**(14): 11126-34.
- Kim, S. W., Rhee, H. J., Ko, J., Kim, Y. J., Kim, H. G., Yang, J. M., Choi, E. C. und Na, D. S. (2001).** Inhibition of cytosolic phospholipase A₂ by annexin I. Specific interaction model and mapping of the interaction site. *J Biol Chem* **276**(19): 15712-9.
- Kim, Y. J., Kim, K. P., Han, S. K., Munoz, N. M., Zhu, X., Sano, H., Leff, A. R. und Cho, W. (2002a).** Group V phospholipase A₂ induces leukotriene biosynthesis in human neutrophils through the activation of group IVA phospholipase A₂. *J Biol Chem* **277**(39): 36479-88.
- Kim, Y. J., Kim, K. P., Rhee, H. J., Das, S., Rafter, J. D., Oh, Y. S. und Cho, W. (2002b).** Internalized group V secretory phospholipase A₂ acts on the perinuclear membranes. *J Biol Chem* **277**(11): 9358-65.
- Kimsey, P. B., Engers, H. D., Hirt, B. und Jongeneel, C. V. (1986).** Pathogenicity of fibroblast- and lymphocyte-specific variants of minute virus of mice. *J Virol* **59**(1): 8-13.
- Kishino, J., Kawamoto, K., Ishizaki, J., Verheij, H. M., Ohara, O. und Arita, H. (1995).** Pancreatic-type phospholipase A₂ activates prostaglandin E₂ production in rat mesangial cells by receptor binding reaction. *J Biochem (Tokyo)* **117**(2): 420-4.
- Kishore, J. und Kapoor, A. (2000).** Erythrovirus B19 infection in humans. *Indian J Med Res* **112**: 149-64.
- Krady, J. K. und Ward, D. C. (1995).** Transcriptional activation by the parvoviral nonstructural protein NS-1 is mediated via a direct interaction with Sp1. *Mol Cell Biol* **15**(1): 524-33.
- Kudo, I. (2004).** Diversity of phospholipase A₂ enzymes. Foreword. *Biol Pharm Bull* **27**(8): 1157.
- Kudo, I. und Murakami, M. (1999).** Diverse functional coupling of prostanoid biosynthetic enzymes in various cell types. *Adv Exp Med Biol* **469**: 29-35.
- Kudo, I. und Murakami, M. (2002).** Phospholipase A₂ enzymes. *Prostaglandins Other Lipid Mediat* **68-69**: 3-58.
- Kudo, I., Murakami, M., Hara, S. und Inoue, K. (1993).** Mammalian non-pancreatic phospholipases A₂. *Biochim Biophys Acta* **1170**(3): 217-31.
- Kundu, G. C. und Mukherjee, A. B. (1997).** Evidence that porcine pancreatic phospholipase A₂ via its high affinity receptor stimulates extracellular matrix invasion by normal and cancer cells. *J Biol Chem* **272**(4): 2346-53.
- Kuwata, H., Nakatani, Y., Murakami, M. und Kudo, I. (1998).** Cytosolic phospholipase A₂ is required for cytokine-induced expression of type IIA secretory phospholipase A₂ that mediates optimal cyclooxygenase-2-dependent delayed prostaglandin E₂ generation in rat 3Y1 fibroblasts. *J Biol Chem* **273**(3): 1733-40.

- Kuwata, H., Yamamoto, S., Miyazaki, Y., Shimbara, S., Nakatani, Y., Suzuki, H., Ueda, N., Yamamoto, S., Murakami, M. und Kudo, I. (2000). Studies on a mechanism by which cytosolic phospholipase A₂ regulates the expression and function of type IIA secretory phospholipase A₂. *J Immunol* **165**(7): 4024-31.
- Labieniec-Pintel, L. und Pintel, D. (1986). The minute virus of mice P39 transcription unit can encode both capsid proteins. *J Virol* **57**(3): 1163-7.
- Lachmann, S., Rommeleare, J. und Nüesch, J. P. (2003). Novel PKCeta is required to activate replicative functions of the major nonstructural protein NS1 of minute virus of mice. *J Virol* **77**(14): 8048-60.
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-5.
- Lambeau, G. und Lazdunski, M. (1999). Receptors for a growing family of secreted phospholipases A₂. *Trends Pharmacol Sci* **20**(4): 162-70.
- Lambeau, G., Schmid-Alliana, A., Lazdunski, M. und Barhanin, J. (1990). Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipases A₂ in skeletal muscle. *J Biol Chem* **265**(16): 9526-32.
- Lang, S. I., Boelz, S., Stroh-Dege, A. Y., Rommelaere, J., Dinsart, C. und Cornelis, J. J. (2005). The infectivity and lytic activity of minute virus of mice wild-type and derived vector particles are strikingly different. *J Virol* **79**(1): 289-98.
- Larsson Forsell, P. K., Runarsson, G., Ibrahim, M., Bjorkholm, M. und Claesson, H. E. (1998). On the expression of cytosolic calcium-independent phospholipase A₂ (88kDa) in immature and mature myeloid cells and its role in leukotriene synthesis in human granulocytes. *FEBS Lett* **434**(3): 295-9.
- Legendre, D. und Rommelaere, J. (1994). Targeting of promoters for trans activation by a carboxy-terminal domain of the NS-1 protein of the parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **68**(12): 7974-85.
- Legrand, C., Mousset, S., Salome, N. und Rommelaere, J. (1992). Cooperation of oncogenes in cell transformation and sensitization to killing by the parvovirus minute virus of mice. *J Gen Virol* **73** (Pt 8): 2003-9.
- Legrand, C., Rommelaere, J. und Caillet-Fauquet, P. (1993). MVM(p) NS-2 protein expression is required with NS-1 for maximal cytotoxicity in human transformed cells. *Virology* **195**(1): 149-55.
- Leslie, C. C. (1997). Properties and regulation of cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* **272**(27): 16709-12.
- Leslie, C. C., Voelker, D. R., Channon, J. Y., Wall, M. M. und Zelarney, P. T. (1988). Properties and purification of an arachidonoyl-hydrolyzing phospholipase A₂ from a macrophage cell line, RAW 264.7. *Biochim Biophys Acta* **963**(3): 476-92.
- Li, X. und Rhode, S. L., 3rd (1991). Nonstructural protein NS2 of parvovirus H-1 is required for efficient viral protein synthesis and virus production in rat cells in vivo and in vitro. *Virology* **184**(1): 117-30.
- Li, X. und Rhode, S. L., 3rd (1993). The parvovirus H-1 NS2 protein affects viral gene expression through sequences in the 3' untranslated region. *Virology* **194**(1): 10-9.
- Lin, L. L., Wartmann, M., Lin, A. Y., Knopf, J. L., Seth, A. und Davis, R. J. (1993). cPLA₂ is phosphorylated and activated by MAP kinase. *Cell* **72**(2): 269-78.
- Linser, P., Bruning, H. und Armentrout, R. W. (1977). Specific binding sites for a parvovirus, minute virus of mice, on cultured mouse cells. *J Virol* **24**(1): 211-21.
- Linser, P., Bruning, H. und Armentrout, R. W. (1979). Uptake of minute virus of mice into cultured rodent cells. *J Virol* **31**(2): 537-45.

- Lio, Y. C., Reynolds, L. J., Balsinde, J. und Dennis, E. A. (1996).** Irreversible inhibition of Ca^{2+} -independent phospholipase A_2 by methyl arachidonyl fluorophosphonate. *Biochim Biophys Acta* **1302**(1): 55-60.
- Lombardo, E., Ramirez, J. C., Agbandje-McKenna, M. und Almendral, J. M. (2000).** A beta-stranded motif drives capsid protein oligomers of the parvovirus minute virus of mice into the nucleus for viral assembly. *J Virol* **74**(8): 3804-14.
- Lombardo, E., Ramirez, J. C., Garcia, J. und Almendral, J. M. (2002).** Complementary roles of multiple nuclear targeting signals in the capsid proteins of the parvovirus minute virus of mice during assembly and onset of infection. *J Virol* **76**(14): 7049-59.
- Lomonte, B., Moreno, E., Tarkowski, A., Hanson, L. A. und Maccarana, M. (1994).** Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a lysine 49 phospholipase A_2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. *J Biol Chem* **269**(47): 29867-73.
- Lorence, R. M., Katubig, B. B., Reichard, K. W., Reyes, H. M., Phuangsab, A., Sassetti, M. D., Walter, R. J. und Peeples, M. E. (1994).** Complete regression of human fibrosarcoma xenografts after local Newcastle disease virus therapy. *Cancer Res* **54**(23): 6017-21.
- Lum, G. S. und Schreiner, A. W. (1963).** Study Of A Virus Isolated From A Chloroleukemic Wistar Rat. *Cancer Res* **23**: 1742-7.
- Luschen, S., Ussat, S., Kronke, M. und Adam-Klages, S. (1998).** Cleavage of human cytosolic phospholipase A_2 by caspase-1 (ICE) and caspase-8 (FLICE). *Biochem Biophys Res Commun* **253**(1): 92-8.
- Mao-Qiang, M., Jain, M., Feingold, K. R. und Elias, P. M. (1996).** Secretory phospholipase A_2 activity is required for permeability barrier homeostasis. *J Invest Dermatol* **106**(1): 57-63.
- Märki, F. und Franson, R. (1986).** Endogenous suppression of neutral-active and calcium-dependent phospholipase A_2 in human polymorphonuclear leukocytes. *Biochim Biophys Acta* **879**(2): 149-56.
- Maroto, B., Valle, N., Saffrich, R. und Almendral, J. M. (2004).** Nuclear export of the nonenveloped parvovirus virion is directed by an unordered protein signal exposed on the capsid surface. *J Virol* **78**(19): 10685-94.
- Maxwell, I. H., Spitzer, A. L., Maxwell, F. und Pintel, D. J. (1995).** The capsid determinant of fibrotropism for the MVMp strain of minute virus of mice functions via VP2 and not VP1. *J Virol* **69**(9): 5829-32.
- McKisic, M. D., Paturzo, F. X. und Smith, A. L. (1996).** Mouse parvovirus infection potentiates rejection of tumor allografts and modulates T cell effector functions. *Transplantation* **61**(2): 292-9.
- Miller, C. L. und Pintel, D. J. (2002).** Interaction between parvovirus NS2 protein and nuclear export factor Crm1 is important for viral egress from the nucleus of murine cells. *J Virol* **76**(7): 3257-66.
- 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? *J Med Virol* **67**(2): 267-74.
- Mizumura, K., Hashimoto, S., Maruoka, S., Gon, Y., Kitamura, N., Matsumoto, K., Hayashi, S., Shimizu, K. und Horie, T. (2003).** Role of mitogen-activated protein kinases in influenza virus induction of prostaglandin E_2 from arachidonic acid in bronchial epithelial cells. *Clin Exp Allergy* **33**(9): 1244-51.
- Morgan, W. R. und Ward, D. C. (1986).** Three splicing patterns are used to excise the small intron common to all minute virus of mice RNAs. *J Virol* **60**(3): 1170-4.

Mounier, C. M., Ghomashchi, F., Lindsay, M. R., James, S., Singer, A. G., Parton, R. G. und Gelb, M. H. (2004). Arachidonic acid release from mammalian cells transfected with human groups IIA and X secreted phospholipase A(2) occurs predominantly during the secretory process and with the involvement of cytosolic phospholipase A(2)-alpha. *J Biol Chem* **279**(24): 25024-38.

Mousset, S., Ouadrhiri, Y., Caillet-Fauquet, P. und Rommelaere, J. (1994). The cytotoxicity of the autonomous parvovirus minute virus of mice nonstructural proteins in FR3T3 rat cells depends on oncogene expression. *J Virol* **68**(10): 6446-53.

Murakami, M. (2004). Hot topics in phospholipase A₂ field. *Biol Pharm Bull* **27**(8): 1179-82.

Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., Higashino, K., Hanasaki, K., Arita, H., Horiguchi, M., Arita, M., Arai, H., Inoue, K. und Kudo, I. (1999a). Different functional aspects of the group II subfamily (Types IIA and V) and type X secretory phospholipase A(2)s in regulating arachidonic acid release and prostaglandin generation. Implications of cyclooxygenase-2 induction and phospholipid scramblase-mediated cellular membrane perturbation. *J Biol Chem* **274**(44): 31435-44.

Murakami, M., Kambe, T., Shimbara, S., Yamamoto, S., Kuwata, H. und Kudo, I. (1999b). Functional association of type IIA secretory phospholipase A(2) with the glycosylphosphatidylinositol-anchored heparan sulfate proteoglycan in the cyclooxygenase-2-mediated delayed prostanoid-biosynthetic pathway. *J Biol Chem* **274**(42): 29927-36.

Murakami, M., Koduri, R. S., Enomoto, A., Shimbara, S., Seki, M., Yoshihara, K., Singer, A., Valentin, E., Ghomashchi, F., Lambeau, G., Gelb, M. H. und Kudo, I. (2001). Distinct arachidonate-releasing functions of mammalian secreted phospholipase A₂s in human embryonic kidney 293 and rat mastocytoma RBL-2H3 cells through heparan sulfate shuttling and external plasma membrane mechanisms. *J Biol Chem* **276**(13): 10083-96.

Murakami, M. und Kudo, I. (2001). Diversity and regulatory functions of mammalian secretory phospholipase A₂s. *Adv Immunol* **77**: 163-94.

Murakami, M. und Kudo, I. (2002). Phospholipase A₂. *J Biochem (Tokyo)* **131**(3): 285-92.

Murakami, M. und Kudo, I. (2003). New phospholipase A(2) isozymes with a potential role in atherosclerosis. *Curr Opin Lipidol* **14**(5): 431-6.

Murakami, M. und Kudo, I. (2004a). Recent advances in molecular biology and physiology of the prostaglandin E₂-biosynthetic pathway. *Prog Lipid Res* **43**(1): 3-35.

Murakami, M. und Kudo, I. (2004b). Secretory phospholipase A₂. *Biol Pharm Bull* **27**(8): 1158-64.

Murakami, M., Kudo, I. und Inoue, K. (1993). Molecular nature of phospholipases A₂ involved in prostaglandin I₂ synthesis in human umbilical vein endothelial cells. Possible participation of cytosolic and extracellular type II phospholipases A₂. *J Biol Chem* **268**(2): 839-44.

Murakami, M., Nakatani, Y. und Kudo, I. (1996). Type II secretory phospholipase A₂ associated with cell surfaces via C-terminal heparin-binding lysine residues augments stimulus-initiated delayed prostaglandin generation. *J Biol Chem* **271**(47): 30041-51.

Murakami, M., Nakatani, Y., Kuwata, H. und Kudo, I. (2000). Cellular components that functionally interact with signaling phospholipase A(2)s. *Biochim Biophys Acta* **1488**(1-2): 159-66.

Murakami, M., Shimbara, S., Kambe, T., Kuwata, H., Winstead, M. V., Tischfield, J. A. und Kudo, I. (1998). The functions of five distinct mammalian phospholipase A₂S in regulating arachidonic acid release. Type IIA and type V secretory phospholipase A₂S are functionally redundant and act in concert with cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* **273**(23): 14411-23.

Muthalif, M. M., Hefner, Y., Canaan, S., Harper, J., Zhou, H., Parmentier, J. H., Aebersold, R., Gelb, M. H. und Malik, K. U. (2001). Functional interaction of calcium/calmodulin-dependent protein kinase II and cytosolic phospholipase A(2). *J Biol Chem* **276**(43): 39653-60.

- Muzyczka, N. a. B., K.I. (2001).** Parvoviridae: The Viruses and Their Replication. *Fields Virology*. D. M. Knipe and P. M. Howley. Philadelphia, PN, LIPPINCOTT WILLIAMS & WILKINS. 2.
- Naeger, L. K., Cater, J. und Pintel, D. J. (1990).** The small nonstructural protein (NS2) of the parvovirus minute virus of mice is required for efficient DNA replication and infectious virus production in a cell-type-specific manner. *J Virol* **64**(12): 6166-75.
- Naeger, L. K., Salome, N. und Pintel, D. J. (1993).** NS2 is required for efficient translation of viral mRNA in minute virus of mice-infected murine cells. *J Virol* **67**(2): 1034-43.
- Nakatani, Y., Tanioka, T., Sunaga, S., Murakami, M. und Kudo, I. (2000).** Identification of a cellular protein that functionally interacts with the C2 domain of cytosolic phospholipase A₂α. *J Biol Chem* **275**(2): 1161-8.
- Nalefski, E. A., Sultzman, L. A., Martin, D. M., Kriz, R. W., Towler, P. S., Knopf, J. L. und Clark, J. D. (1994).** Delineation of two functionally distinct domains of cytosolic phospholipase A₂, a regulatory Ca⁽²⁺⁾-dependent lipid-binding domain and a Ca⁽²⁺⁾-independent catalytic domain. *J Biol Chem* **269**(27): 18239-49.
- Nemenoff, R. A., Winitz, S., Qian, N. X., Van Putten, V., Johnson, G. L. und Heasley, L. E. (1993).** Phosphorylation and activation of a high molecular weight form of phospholipase A₂ by p42 microtubule-associated protein 2 kinase and protein kinase C. *J Biol Chem* **268**(3): 1960-4.
- Nguyen, Q. T., Sifer, C., Schneider, V., Allaume, X., Servant, A., Bernaudin, F., Auguste, V. und Garbarg-Chenon, A. (1999).** Novel human erythrovirus associated with transient aplastic anemia. *J Clin Microbiol* **37**(8): 2483-7.
- Nüesch, J. P., Christensen, J. und Rommelaere, J. (2001).** Initiation of minute virus of mice DNA replication is regulated at the level of origin unwinding by atypical protein kinase C phosphorylation of NS1. *J Virol* **75**(13): 5730-9.
- Nüesch, J. P., Corbau, R., Tattersall, P. und Rommelaere, J. (1998).** Biochemical activities of minute virus of mice nonstructural protein NS1 are modulated In vitro by the phosphorylation state of the polypeptide. *J Virol* **72**(10): 8002-12.
- Nüesch, J. P., Cotmore, S. F. und 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. *Virology* **209**(1): 122-35.
- Nüesch, J. P., Dettwiler, S., Corbau, R. und Rommelaere, J. (1998).** Replicative functions of minute virus of mice NS1 protein are regulated in vitro by phosphorylation through protein kinase C. *J Virol* **72**(12): 9966-77.
- Nüesch, J. P., Lachmann, S., Corbau, R. und Rommelaere, J. (2003).** Regulation of minute virus of mice NS1 replicative functions by atypical PKCλ in vivo. *J Virol* **77**(1): 433-42.
- Nüesch, J. P., Lachmann, S. und Rommelaere, J. (2005).** Selective alterations of the host cell architecture upon infection with parvovirus minute virus of mice. *Virology* **331**(1): 159-74.
- Nüesch, J. P. und Tattersall, P. (1993).** Nuclear targeting of the parvoviral replicator molecule NS1: evidence for self-association prior to nuclear transport. *Virology* **196**(2): 637-51.
- Ogston, P., Raj, K. und Beard, P. (2000).** Productive replication of adeno-associated virus can occur in human papillomavirus type 16 (HPV-16) episome-containing keratinocytes and is augmented by the HPV-16 E2 protein. *J Virol* **74**(8): 3494-504.
- Ohshima, T., Iwama, M., Ueno, Y., Sugiyama, F., Nakajima, T., Fukamizu, A. und Yagami, K. (1998).** Induction of apoptosis in vitro and in vivo by H-1 parvovirus infection. *J Gen Virol* **79** (Pt 12): 3067-71.
- Okochi, K., Mori, R., Miyazaki, M., Cohen, B. J. und Mortimer, P. P. (1984).** Nakatani antigen and human parvovirus (B19). *Lancet* **1**(8369): 160-1.

- Olijslagers, S., Dege, A. Y., Dinsart, C., Voorhoeve, M., Rommelaere, J., Noteborn, M. H. und Cornelis, J. J. (2001). Potentiation of a recombinant oncolytic parvovirus by expression of Apoptin. *Cancer Gene Ther* 8(12): 958-65.
- Ono, T., Yamada, K., Chikazawa, Y., Ueno, M., Nakamoto, S., Okuno, T. und Seno, K. (2002). Characterization of a novel inhibitor of cytosolic phospholipase A₂alpha, pyrrophenone. *Biochem J* 363(Pt 3): 727-35.
- Op De Beeck, A., Anouja, F., Mousset, S., Rommelaere, J. und Caillet-Fauquet, P. (1995). The nonstructural proteins of the autonomous parvovirus minute virus of mice interfere with the cell cycle, inducing accumulation in G2. *Cell Growth Differ* 6(7): 781-7.
- Op De Beeck, A. und 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? *J Virol* 71(7): 5323-9.
- Op De Beeck, A., Sobczak-Thepot, J., Sirma, H., Bourgain, F., Brechot, C. und Caillet-Fauquet, P. (2001). NS1- and minute virus of mice-induced cell cycle arrest: involvement of p53 and p21(cip1). *J Virol* 75(22): 11071-8.
- Paradiso, P. R. (1981). Infectious process of the parvovirus H-1: correlation of protein content, particle density, and viral infectivity. *J Virol* 39(3): 800-7.
- Park, D. W., Kim, J. R., Kim, S. Y., Sonn, J. K., Bang, O. S., Kang, S. S., Kim, J. H. und Baek, S. H. (2003). Akt as a mediator of secretory phospholipase A₂ receptor-involved inducible nitric oxide synthase expression. *J Immunol* 170(4): 2093-9.
- Parker, J. S., Murphy, W. J., Wang, D., O'Brien, S. J. und Parrish, C. R. (2001). Canine and feline parvoviruses can use human or feline transferrin receptors to bind, enter, and infect cells. *J Virol* 75(8): 3896-902.
- Patrat, C., Serres, C. und Jouannet, P. (2000). The acrosome reaction in human spermatozoa. *Biol Cell* 92(3-4): 255-66.
- Pattison, J. R. (1987). B19 virus--a pathogenic human parvovirus. *Blood Rev* 1(1): 58-64.
- Pear, W. S., Nolan, G. P., Scott, M. L. und Baltimore, D. (1993). Production of high-titer helper-free retroviruses by transient transfection. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90(18): 8392-6.
- Perez, L., Irurzun, A. und Carrasco, L. (1993). Activation of phospholipase activity during Semliki Forest virus infection. *Virology* 194(1): 28-36.
- Perez, R., Melero, R., Balboa, M. A. und Balsinde, J. (2004). Role of group VIA calcium-independent phospholipase A₂ in arachidonic acid release, phospholipid fatty acid incorporation, and apoptosis in U937 cells responding to hydrogen peroxide. *J Biol Chem* 279(39): 40385-91.
- Pintel, D., Dadachanji, D., Astell, C. R. und Ward, D. C. (1983). The genome of minute virus of mice, an autonomous parvovirus, encodes two overlapping transcription units. *Nucleic Acids Res* 11(4): 1019-38.
- Pompeia, C., Lima, T. und Curi, R. (2003). Arachidonic acid cytotoxicity: can arachidonic acid be a physiological mediator of cell death? *Cell Biochem Funct* 21(2): 97-104.
- Potts, B. C., Faulkner, D. J. und Jacobs, R. S. (1992). Phospholipase A₂ inhibitors from marine organisms. *J Nat Prod* 55(12): 1701-17.
- Pringle, C. R. (1998). Virus taxonomy - San Diego. *Arch. Virol.* 143: 1449-1459.
- Qing, K., Mah, C., Hansen, J., Zhou, S., Dwarki, V. und Srivastava, A. (1999). Human fibroblast growth factor receptor 1 is a co-receptor for infection by adeno-associated virus 2. *Nat Med* 5(1): 71-7.

- Qiu, Z. H., Gijon, M. A., de Carvalho, M. S., Spencer, D. M. und Leslie, C. C. (1998).** The role of calcium and phosphorylation of cytosolic phospholipase A₂ in regulating arachidonic acid release in macrophages. *J Biol Chem* **273**(14): 8203-11.
- Raab, U., Beckenlehner, K., Lowin, T., Niller, H. H., Doyle, S. und 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. *Virology* **293**(1): 86-93.
- Ran, Z., Rayet, B., Rommelaere, J. und Faisst, S. (1999).** Parvovirus H-1-induced cell death: influence of intracellular NAD consumption on the regulation of necrosis and apoptosis. *Virus Res* **65**(2): 161-74.
- Ran, Z. H., Liu, J., Feng, Y., Zou, J. und Xiao, S. D. (2004).** Investigation of the sensitivities of distinct gastric cancer cells to parvovirus H-1 induced cytotoxicity. *Chin J Dig Dis* **5**(3): 93-7.
- Rayet, B., Lopez-Guerrero, J. A., Rommelaere, J. und Dinsart, C. (1998).** Induction of programmed cell death by parvovirus H-1 in U937 cells: connection with the tumor necrosis factor alpha signalling pathway. *J Virol* **72**(11): 8893-903.
- Rhode, S. L. (1973).** Replication process of the parvovirus H-1. I. Kinetics in a parasynchronous cell system. *J Virol* **11**(6): 856-61.
- Rhode, S. L. (1976).** Replication process of the parvovirus H-1 V. Isolation and characterization of temperature-sensitive H-1 mutants. *J Virol* **17**(2): 659-67.
- Rhode, S. L. (1985).** trans-Activation of parvovirus P38 promoter by the 76K noncapsid protein. *J Virol* **55**(3): 886-9.
- Rhode, S. L. und Richard, S. M. (1987).** Characterization of the trans-activation-responsive element of the parvovirus H-1 P38 promoter. *J Virol* **61**(9): 2807-15.
- Richards, R., Linser, P. und Armentrout, R. W. (1977).** Kinetics of assembly of a parvovirus, minute virus of mice, in synchronized rat brain cells. *J Virol* **22**(3): 778-93.
- Richards, R. G. und Armentrout, R. W. (1979).** Early events in parvovirus replication: lack of integration by minute virus of mice into host cell DNA. *J Virol* **30**(1): 397-9.
- Rommelaere, J. und Cornelis, J. J. (1991).** Antineoplastic activity of parvoviruses. *J Virol Methods* **33**(3): 233-51.
- Rommelaere, J. und Cornelis, J. J. (2001).** Autonomous Parvoviruses. *Replication-competent Viruses for Cancer Therapy*. R. S. Hernaiz Driever P. Basel, Monogr Virol. Basel, Karger. **22**: 100-129.
- Ros, C., Burckhardt, C. J. und Kempf, C. (2002).** Cytoplasmic trafficking of minute virus of mice: low-pH requirement, routing to late endosomes, and proteasome interaction. *J Virol* **76**(24): 12634-45.
- Ros, C. und Kempf, C. (2004).** The ubiquitin-proteasome machinery is essential for nuclear translocation of incoming minute virus of mice. *Virology* **324**(2): 350-60.
- Salgo, M. G., Corongiu, F. P. und Sevanian, A. (1993).** Enhanced interfacial catalysis and hydrolytic specificity of phospholipase A₂ toward peroxidized phosphatidylcholine vesicles. *Arch Biochem Biophys* **304**(1): 123-32.
- Salome, N., van Hille, B., Duponchel, N., Meneguzzi, G., Cuzin, F., Rommelaere, J. und Cornelis, J. J. (1990).** Sensitization of transformed rat cells to parvovirus MVMP is restricted to specific oncogenes. *Oncogene* **5**(1): 123-30.
- Sambrook J., F. E., Maniatis T. (1989).** *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor, N.Y., Cold Spring Harbor Laboratory.

- Santaren, J. F., Ramirez, J. C. und Almendral, J. M. (1993).** Protein species of the parvovirus minute virus of mice strain MVMP: involvement of phosphorylated VP-2 subtypes in viral morphogenesis. *J Virol* **67**(9): 5126-38.
- Sapirstein, A. und Bonventre, J. V. (2000a).** Phospholipases A₂ in ischemic and toxic brain injury. *Neurochem Res* **25**(5): 745-53.
- Sapirstein, A. und Bonventre, J. V. (2000b).** Specific physiological roles of cytosolic phospholipase A(2) as defined by gene knockouts. *Biochim Biophys Acta* **1488**(1-2): 139-48.
- Sapirstein, A., Spech, R. A., Witzgall, R. und Bonventre, J. V. (1996).** Cytosolic phospholipase A₂ (PLA₂), but not secretory PLA₂, potentiates hydrogen peroxide cytotoxicity in kidney epithelial cells. *J Biol Chem* **271**(35): 21505-13.
- Schevitz, R. W., Bach, N. J., Carlson, D. G., Chirgadze, N. Y., Clawson, D. K., Dillard, R. D., Draheim, S. E., Hartley, L. W., Jones, N. D., Mihelich, E. D. und et al. (1995).** Structure-based design of the first potent and selective inhibitor of human non-pancreatic secretory phospholipase A₂. *Nat Struct Biol* **2**(6): 458-65.
- Schievella, A. R., Regier, M. K., Smith, W. L. und Lin, L. L. (1995).** Calcium-mediated translocation of cytosolic phospholipase A₂ to the nuclear envelope and endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **270**(51): 30749-54.
- Scholz, K., Vlachojannis, G. J., Spitzer, S., Schini-Kerth, V., Van Den Bosch, H., Kaszkin, M. und Pfeilschifter, J. (1999).** Modulation of cytokine-induced expression of secretory phospholipase A₂-type IIA by protein kinase C in rat renal mesangial cells. *Biochem Pharmacol* **58**(11): 1751-8.
- Seilhamer, J. J., Pruzanski, W., Vadas, P., Plant, S., Miller, J. A., Kloss, J. und Johnson, L. K. (1989).** Cloning and recombinant expression of phospholipase A₂ present in rheumatoid arthritic synovial fluid. *J Biol Chem* **264**(10): 5335-8.
- Seno, K., Okuno, T., Nishi, K., Murakami, Y., Watanabe, F., Matsuura, T., Wada, M., Fujii, Y., Yamada, M., Ogawa, T., Okada, T., Hashizume, H., Kii, M., Hara, S., Hagishita, S., Nakamoto, S., Yamada, K., Chikazawa, Y., Ueno, M., Teshirogi, I., Ono, T. und Ohtani, M. (2000).** Pyrrolidine inhibitors of human cytosolic phospholipase A(2). *J Med Chem* **43**(6): 1041-4.
- Sevanian, A., Wratten, M. L., McLeod, L. L. und Kim, E. (1988).** Lipid peroxidation and phospholipase A₂ activity in liposomes composed of unsaturated phospholipids: a structural basis for enzyme activation. *Biochim Biophys Acta* **961**(3): 316-27.
- Shmelzer, Z., Haddad, N., Admon, E., Pessach, I., Leto, T. L., Eitan-Hazan, Z., Hershinkel, M. und Levy, R. (2003).** Unique targeting of cytosolic phospholipase A₂ to plasma membranes mediated by the NADPH oxidase in phagocytes. *J Cell Biol* **162**(4): 683-92.
- Silliman, C. C., Moore, E. E., Zallen, G., Gonzalez, R., Johnson, J. L., Elzi, D. J., Meng, X., Hanasaki, K., Ishizaki, J., Arita, H., Ao, L., England, K. M. und Banerjee, A. (2002).** Presence of the M-type sPLA(2) receptor on neutrophils and its role in elastase release and adhesion. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(4): C1102-13.
- Singer, A. G., Ghomashchi, F., Le Calvez, C., Bollinger, J., Bezzine, S., Rouault, M., Sadilek, M., Nguyen, E., Lazdunski, M., Lambeau, G. und Gelb, M. H. (2002).** Interfacial kinetic and binding properties of the complete set of human and mouse groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A₂. *J Biol Chem* **277**(50): 48535-49.
- Six, D. A. und Dennis, E. A. (2000).** The expanding superfamily of phospholipase A(2) enzymes: classification and characterization. *Biochim Biophys Acta* **1488**(1-2): 1-19.
- Smart, B. P., Pan, Y. H., Weeks, A. K., Bollinger, J. G., Bahnson, B. J. und Gelb, M. H. (2004).** Inhibition of the complete set of mammalian secreted phospholipases A(2) by indole analogues: a structure-guided study. *Bioorg Med Chem* **12**(7): 1737-49.

- Spalholz, B. A. und Tattersall, P. (1983).** Interaction of minute virus of mice with differentiated cells: strain-dependent target cell specificity is mediated by intracellular factors. *J Virol* **46**(3): 937-43.
- Spegelaere, P., van Hille, B., Spruyt, N., Faisst, S., Cornelis, J. J. und Rommelaere, J. (1991).** Initiation of transcription from the minute virus of mice P4 promoter is stimulated in rat cells expressing a c-Ha-ras oncogene. *J Virol* **65**(9): 4919-28.
- Stahelin, R. V., Rafter, J. D., Das, S. und Cho, W. (2003).** The molecular basis of differential subcellular localization of C2 domains of protein kinase C- α and group IVa cytosolic phospholipase A₂. *J Biol Chem* **278**(14): 12452-60.
- Steer, S. A., Wirsig, K. C., Creer, M. H., Ford, D. A. und McHowat, J. (2002).** Regulation of membrane-associated iPLA₂ activity by a novel PKC isoform in ventricular myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol* **283**(6): C1621-6.
- Street, I. P., Lin, H. K., Laliberte, F., Ghomashchi, F., Wang, Z., Perrier, H., Tremblay, N. M., Huang, Z., Weech, P. K. und Gelb, M. H. (1993).** Slow- and tight-binding inhibitors of the 85-kDa human phospholipase A₂. *Biochemistry* **32**(23): 5935-40.
- Suikkanen, S., Aaltonen, T., Nevalainen, M., Valilehto, O., Lindholm, L., Vuento, M. und Vihinen-Ranta, M. (2003a).** Exploitation of microtubule cytoskeleton and dynein during parvoviral traffic toward the nucleus. *J Virol* **77**(19): 10270-9.
- Suikkanen, S., Antila, M., Jaatinen, A., Vihinen-Ranta, M. und Vuento, M. (2003b).** Release of canine parvovirus from endocytic vesicles. *Virology* **316**(2): 267-80.
- Suikkanen, S., Saajarvi, K., Hirsimäki, J., Valilehto, O., Reunanen, H., Vihinen-Ranta, M. und Vuento, M. (2002).** Role of recycling endosomes and lysosomes in dynein-dependent entry of canine parvovirus. *J Virol* **76**(9): 4401-11.
- Summerford, C., Bartlett, J. S. und Samulski, R. J. (1999).** AlphaVbeta5 integrin: a co-receptor for adeno-associated virus type 2 infection. *Nat Med* **5**(1): 78-82.
- Summerford, C. und Samulski, R. J. (1998).** Membrane-associated heparan sulfate proteoglycan is a receptor for adeno-associated virus type 2 virions. *J Virol* **72**(2): 1438-45.
- Tattersall, P. und Bratton, J. (1983).** Reciprocal productive and restrictive virus-cell interactions of immunosuppressive and prototype strains of minute virus of mice. *J Virol* **46**(3): 944-55.
- Tattersall, P., Shatkin, A. J. und Ward, D. C. (1977).** Sequence homology between the structural polypeptides of minute virus of mice. *J Mol Biol* **111**(4): 375-94.
- Tattersall, P. und Ward, D. C. (1976).** Rolling hairpin model for replication of parvovirus and linear chromosomal DNA. *Nature* **263**(5573): 106-9.
- Thommesen, L., Sjørnsen, W., Gasvik, K., Hanssen, W., Brekke, O. L., Skattebol, L., Holmeide, A. K., Espevik, T., Johansen, B. und Laegreid, A. (1998).** Selective inhibitors of cytosolic or secretory phospholipase A₂ block TNF-induced activation of transcription factor nuclear factor-kappa B and expression of ICAM-1. *J Immunol* **161**(7): 3421-30.
- Thomson, B. J., Weindler, F. W., Gray, D., Schwaab, V. und Heilbronn, R. (1994).** Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* **204**(1): 304-11.
- Thorne, T. E., Voelkel-Johnson, C., Casey, W. M., Parks, L. W. und Laster, S. M. (1996).** The activity of cytosolic phospholipase A₂ is required for the lysis of adenovirus-infected cells by tumor necrosis factor. *J Virol* **70**(12): 8502-7.
- Toolan, H. W. (1961).** A virus associated with transplantable human tumors. *Bull N Y Acad Med* **37**: 305-10.

- Toolan, H. W. (1967).** Lack of oncogenic effect of the H-viruses for hamsters. *Nature* **214**(92): 1036.
- Triggiani, M., Granata, F., Balestrieri, B., Petraroli, A., Scalia, G., Del Vecchio, L. und Marone, G. (2003).** Secretory phospholipases A₂ activate selective functions in human eosinophils. *J Immunol* **170**(6): 3279-88.
- Tullis, G. E., Burger, L. R. und Pintel, D. J. (1993).** The minor capsid protein VP1 of the autonomous parvovirus minute virus of mice is dispensable for encapsidation of progeny single-stranded DNA but is required for infectivity. *J Virol* **67**(1): 131-41.
- Tullis, G. E., Labieniec-Pintel, L., Clemens, K. E. und Pintel, D. (1988).** Generation and characterization of a temperature-sensitive mutation in the NS-1 gene of the autonomous parvovirus minute virus of mice. *J Virol* **62**(8): 2736-44.
- Vadas, P. (1997).** Group II phospholipases A₂ are indirectly cytolytic in the presence of exogenous phospholipid. *Biochim Biophys Acta* **1346**(2): 193-7.
- Van Hille, B., Duponchel, N., Salome, N., Spruyt, N., Cotmore, S. F., Tattersall, P., Cornelis, J. J. und Rommelaere, J. (1989).** Limitations to the expression of parvoviral nonstructural proteins may determine the extent of sensitization of EJ-ras-transformed rat cells to minute virus of mice. *Virology* **171**(1): 89-97.
- Van Pachterbeke, C., Tuynder, M., Cosyn, J. P., Lespagnard, L., Larsimont, D. und Rommelaere, J. (1993).** Parvovirus H-1 inhibits growth of short-term tumor-derived but not normal mammary tissue cultures. *Int J Cancer* **55**(4): 672-7.
- Vanacker, J. M., Laudet, V., Adelmant, G., Stehelin, D. und Rommelaere, J. (1993).** Interconnection between thyroid hormone signalling pathways and parvovirus cytotoxic functions. *J Virol* **67**(12): 7668-72.
- Vervordeldonk, M. J., van Rossum, G. S., Sanchez, R. M., Neys, F. W. und van den Bosch, H. (1997).** Half-life of interleukin-1 beta-induced group II phospholipase A₂ in rat mesangial cells. *Biochim Biophys Acta* **1355**(3): 315-22.
- Vihinen-Ranta, M., Kakkola, L., Kalela, A., Vilja, P. und Vuento, M. (1997).** Characterization of a nuclear localization signal of canine parvovirus capsid proteins. *Eur J Biochem* **250**(2): 389-94.
- Vihinen-Ranta, M., Kalela, A., Makinen, P., Kakkola, L., Marjomaki, V. und Vuento, M. (1998).** Intracellular route of canine parvovirus entry. *J Virol* **72**(1): 802-6.
- Vihinen-Ranta, M., Wang, D., Weichert, W. S. und Parrish, C. R. (2002).** The VP1 N-terminal sequence of canine parvovirus affects nuclear transport of capsids and efficient cell infection. *J Virol* **76**(4): 1884-91.
- Vihinen-Ranta, M., Yuan, W. und Parrish, C. R. (2000).** Cytoplasmic trafficking of the canine parvovirus capsid and its role in infection and nuclear transport. *J Virol* **74**(10): 4853-9.
- Weltzien, H. U. (1979).** Cytolytic and membrane-perturbing properties of lysophosphatidylcholine. *Biochim Biophys Acta* **559**(2-3): 259-87.
- Wetzel, K., Menten, P., Opdenakker, G., Van Damme, J., Grone, H. J., Giese, N., Vecchi, A., Sozzani, S., Cornelis, J. J., Rommelaere, J. und Dinsart, C. (2001).** Transduction of human MCP-3 by a parvoviral vector induces leukocyte infiltration and reduces growth of human cervical carcinoma cell xenografts. *J Gene Med* **3**(4): 326-37.
- Willwand, K. und Hirt, B. (1993).** The major capsid protein VP2 of minute virus of mice (MVM) can form particles which bind to the 3'-terminal hairpin of MVM replicative-form DNA and package single-stranded viral progeny DNA. *J Virol* **67**(9): 5660-3.
- Wilson, G. M., Jindal, H. K., Yeung, D. E., Chen, W. und Astell, C. R. (1991).** Expression of minute virus of mice major nonstructural protein in insect cells: purification and identification of ATPase and helicase activities. *Virology* **185**(1): 90-8.

- Winstead, M. V., Balsinde, J. und Dennis, E. A. (2000).** Calcium-independent phospholipase A₂: structure and function. *Biochim Biophys Acta* **1488**(1-2): 28-39.
- Wissing, D., Mouritzen, H., Egeblad, M., Poirier, G. G. und Jaattela, M. (1997).** Involvement of caspase-dependent activation of cytosolic phospholipase A₂ in tumor necrosis factor-induced apoptosis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(10): 5073-7.
- Wolf, M. J., Wang, J., Turk, J. und Gross, R. W. (1997).** Depletion of intracellular calcium stores activates smooth muscle cell calcium-independent phospholipase A₂. A novel mechanism underlying arachidonic acid mobilization. *J Biol Chem* **272**(3): 1522-6.
- Wolter, S., Richards, R. und Armentrout, R. W. (1980).** Cell cycle-dependent replication of the DNA of minute virus of mice, a parvovirus. *Biochim Biophys Acta* **607**(3): 420-31.
- Yagami, T., Ueda, K., Asakura, K., Hata, S., Kuroda, T., Sakaeda, T., Takasu, N., Tanaka, K., Gemba, T. und Hori, Y. (2002a).** Human group IIA secretory phospholipase A₂ induces neuronal cell death via apoptosis. *Mol Pharmacol* **61**(1): 114-26.
- Yagami, T., Ueda, K., Asakura, K., Hayasaki-Kajiwar, Y., Nakazato, H., Sakaeda, T., Hata, S., Kuroda, T., Takasu, N. und Hori, Y. (2002b).** Group IB secretory phospholipase A₂ induces neuronal cell death via apoptosis. *J Neurochem* **81**(3): 449-61.
- Yang, T. J. (1987).** Parvovirus-induced regression of canine transmissible venereal sarcoma. *Am J Vet Res* **48**(5): 799-800.
- Zadori, Z., Szelei, J., Lacoste, M. C., Li, Y., Gariepy, S., Raymond, P., Allaire, M., Nabi, I. R. und Tijssen, P. (2001).** A viral phospholipase A₂ is required for parvovirus infectivity. *Dev Cell* **1**(2): 291-302.
- Zvaritch, E., Lambeau, G. und Lazdunski, M. (1996).** Endocytic properties of the M-type 180-kDa receptor for secretory phospholipases A₂. *J Biol Chem* **271**(1): 250-7.