

Aus dem Institut für Mikrobiologie und Hygiene
der Medizinischen Fakultät Mannheim
Direktor: Prof. Dr. med. Thomas Miethke

Einfluss einer Masernvirusinfektion auf die Transkription und Translation
des Proteins STING in humanen dendritischen Zellen sowie im THP-1-
Zellmodell

Inauguraldissertation
zur Erlangung des medizinischen Doktorgrades
der
Medizinischen Fakultät Mannheim
der Ruprecht-Karls-Universität
zu
Heidelberg

vorgelegt von
Judith Ingrid Dremel

aus
Nürnberg
2023

Dekan: Prof. Dr. med. Sergij Goerd
Referent: Prof. Dr. med. Thomas Miethke

INHALTSVERZEICHNIS

Seite

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	1
1 EINLEITUNG	4
1.1 Das Masernvirus.....	4
1.2 Das Immunsystem.....	8
1.3 Ziel der Arbeit.....	14
2 MATERIAL UND METHODEN.....	15
2.1 Material.....	15
2.1.1 Biologische Materialien.....	15
2.1.2 Antikörper (AK).....	15
2.1.3 Chemikalien.....	16
2.1.4 Verbrauchsmaterialien.....	16
2.1.5 Kits.....	17
2.1.6 Geräte.....	17
2.2 Methoden	20
2.2.1 Zellgewinnung und Zellkultur der DC.....	20
2.2.2 Zelldifferenzierung und Kultur der THP-1-Zellen	22
2.2.3 Virusanzucht.....	23
2.2.4 Virustitration.....	23
2.2.5 Infektion	24
2.2.6 PCR.....	24
2.2.7 Western Blot	26
2.2.8 ELISA	27
3 ERGEBNISSE	29
3.1 Zytopathischer Effekt als Nachweis einer Infektion	29
3.2 STING Modulation von humanen DC durch das MV	30

3.2.1	Modulation der RNA-Expression von STING 24 h p.i. durch MV.....	30
3.2.2	Abnehmende STING-Transkription und -Translation über 2, 6 und 24 h p.i.....	32
3.3	Reduktion der STING- und der IFN- β -Konzentration durch Infektion von THP-1 Zellen durch das MV	36
3.3.1	Reduktion der STING-Expression von THP-1 Zellen 24 Stunden nach Infektion mit dem MV	36
3.3.2	Reduktion des STING-Proteins in einer WB-Kinetik mit 2, 6 und 24 h p.i.....	39
3.3.3	Signifikante Reduktion der IFN- β Konzentration nach Infektion und Stimulation von THP-1-Zellen	41
3.3.4	Die LPS induzierte TNF- α -Sekretion wird durch eine Maserninfektion nicht beeinflusst.....	43
4	DISKUSSION	45
4.1	Deutlichere Reduktion der STING-Expression durch Wildtypstämme.....	45
4.2	Reduktion der STING-Antwort nach 24 h im THP-1-Zellmodell.....	46
4.3	Nicht titrierbare Inhibition der Interferoninduktion	47
4.4	Erstbeschreibung einer Reduktion der STING Expression durch LPS	48
4.5	Single Nukleotide Polymorphismen von STING und deren Auswirkung.....	49
4.6	Zusammenfassung.....	49
5	ZUSAMMENFASSUNG.....	51
6	LITERATURVERZEICHNIS.....	53
7	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	56
8	LEBENS LAUF	57
9	DANKSAGUNG.....	58

Meiner Familie

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

AK	Antikörper
ANOVA	Varianzanalyse (Analysis of Variance)
APC	antigenpräsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
Ber	Berlin
BSA	Bovines Serumalbumin
cDNA	komplementäre DNA
cGAMP	zyklisches Guanosinmonophosphat-Adenosinmonophosphat
cGAS	zyklische GMP-AMP Synthase
CPE	zytopathischer Effekt
DC	dendritische Zellen
diRNA	defektive interferierende RNA
DNA	Desoxyribonukleinsäure (desoxyribonucleinacid)
ED	Edmonston Virusstamm
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	antikörperbasiertes Nachweisverfahren (Enzyme-linked Immunosorbent Assay)
ER	endoplasmatisches Retikulum
FACS	Durchflusszytometrie (fluorescence-activated cell sorter)
FKS	Fetales Kälberserum
F-Protein	Fusionsprotein
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierender Faktor
gt	Ziege (goat)
GTP	Guanosintriphosphat
HAQ	STING Mutation R71H-G230A-R293Q
H-Protein	Hämagglutininprotein
hu	human
IF	Immunfluoreszenz-Färbung
IFN	Interferon
IL	Interleukin
ISG	Interferon-stimulierte Gene

L-Protein	Largeprotein
LPS	Lipopolysaccharid
LSM	Lymphozytenseparationsmedium
IRF3	Interferon-Regulationsfaktor 3
MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex
MIBE	Masern-Einschlusskörper-Enzephalitis (measles inclusion body encephalitis)
moi	Multiplizität der Infektion (multiplicity of infection)
M-Protein	Matrixprotein
mRNA	Boten-RNA (messenger RNA)
ms	Maus
MV	Masernvirus
NF-κB	nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells
nm	Nanometer
N-Protein	Nukleosidprotein
PAMP	Pathogen-assoziierte molekulare Muster
PBMC	Monozyten des peripheren Blutes (peripheral blood monocytes)
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
p.i.	post infectionem
PMA	4-Methoxyamphetamin
P-Protein	Phosphoprotein
PRR	mustererkennender Rezeptor (pattern recognition receptor)
rb	Kaninchen (rabbit)
RIPA	Radioimmunpräzitationspuffer
RNA	Ribonukleinsäure (ribonucleic acid)
RNP	Ribonukleokapsid
rpm	Umdrehungen pro Minute (rounds per minute)
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SLAM	signaling lymphocyte activation molecule (CD150)
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis
STIKO	Ständige Impfkommission

STING	Stimulator-of-Interferone-Genes
TBK 1	TANK-binding kinase 1
TCID ₅₀	Zellkultur Infektionsdosis (Tissue Culture Infectious Dose 50)
TEMED	Tetramethylethylendiamin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF- α	Tumornekrosefaktor- α
UV	Ultraviolett
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WTF	Wildtyp-Fleckenstein

1 EINLEITUNG

1.1 Das Masernvirus

1.1.1 Aktualität des Masernvirus

Seit dem 01. März 2020 gilt das Gesetz für den Schutz vor Masern und zur Stärkung der Impfprävention¹. Kinder müssen nun ab dem vollendeten ersten Lebensjahr bei Eintritt in den Kindergarten, einer Kindertagespflegeeinrichtung oder die Schule einen Nachweis über die von der ständigen Impfkommission (STIKO) jeweils empfohlenen Masernimpfung erbringen. Ebenso gilt eine Impfpflicht für Angestellte in medizinischen und Gemeinschaftseinrichtungen². Ursächlich war ein Anstieg der Infektionsrate aufgrund mangelnder Impfquoten. Für das Jahr 2018 wurden 544 Maserninfektionen an das Robert Koch Institut übermittelt und für 2019 insgesamt 515 Infektionen³. Um eine Herdenimmunität zu erreichen und so auch Menschen zu schützen, die aufgrund einer Immunschwäche oder eines zu geringen Alters nicht geimpft werden können, wird eine zweifach durchgeführte Impfung bei über 95 % der Bevölkerung benötigt⁴. Möglich wäre bei einer solchen Impfquote auch eine vollständige Elimination der Masernkrankheit. Dies ist ein erklärtes Ziel der Weltgesundheitsorganisation (WHO)⁵. Unter den im Jahr 2017 eingeschulten Kindern waren etwa 93 % zweifach gegen Masern geimpft, jedoch Kinder bis zu einem Alter von 24 Monaten nur zu 64,6 %⁶, obwohl es sich hierbei laut STIKO um das empfohlene Alter für den Erhalt der zweiten Schutzimpfung handelt⁷. Das Masernschutzgesetz greift hier ein, um eine Reduktion der Erkrankungen sowie langfristig eine Elimination des Virus in Deutschland zu erreichen. Erste Erfolge habe sich bereits gezeigt, so sank die Zahl der übermittelten Infektionen im Jahr 2020 bereits auf 76².

Weltweit infizierten sich nach Statistik der WHO im Jahr 2020 etwa 7,5 Millionen Menschen mit dem Masernvirus, circa 60.700 unter ihnen mit Todesfolge⁸. Besonders im Kindesalter handelt es sich bei der Masernvirusinfektion um eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit⁹. Auch wenn die Erkrankung nur in unter 1 % einen letalen Verlauf zeigt, kommt es in industrialisierten Ländern bei etwa 10 % der Patienten zu Komplikationen wie einer Otitis media mit eventueller Hörschädigung oder einer Keratitis, welche in südlichen Ländern eine der häufigsten Ursachen für Blindheit im Kindesalter darstellt¹⁰. In Entwicklungsländern treten aufgrund des schlechten Ernährungszustandes und des damit einhergehenden schlechten Immunstatus Komplikationen bei bis zu 80 % der an Masern erkrankten Patienten auf.

Die häufigste Ursache für einen letalen Ausgang der Masernerkrankung ist eine opportunistische Infektion aufgrund der durch das Masernvirus (MV) ausgelösten Immunsuppression¹¹. Die Ursache dieser Immunsuppression ist bis dato nicht vollständig verstanden.

1.1.2 Aufbau des Masernvirus

Das Masernvirus ist ein behülltes, negativ strängiges RNA-Virus. Der Durchmesser beträgt etwa 120 nm. Es zählt zu der Familie der Paramyxoviridae. Das einzige Reservoir ist der Mensch, auch wenn Primaten unter experimentellen Bedingungen mit Wildtypstämmen infiziert werden können¹².

Die genomische Ribonukleinsäure (RNA) kodiert 6 Strukturproteine. Das Phospho (P)- und das Large (L)-Protein bilden zusammen die RNA-Polymerase. Der für des P-Protein kodierende Bereich beinhaltet zwei überlappende, offene Lesefenster für zwei weitere Proteine, das V- und C-Protein. Diese sind keine Strukturproteine, jedoch an der durch das Masernvirus vermittelten Immunsuppression beteiligt¹³. Das Fusions (F)- und das Hämagglutininprotein (H) führen zur Verschmelzung der viralen und humanen Zellmembran. Sie werden daher auf der Virusoberfläche exprimiert. Die Regulation der Transkription erfolgt über das Matrixprotein (M) und über das Nucleosidprotein (N). Das M-Protein ist ebenso für die Freisetzung neuer Viren essenziell und das N-Protein für die Enkapsierung (siehe Abbildung 1)¹⁴.

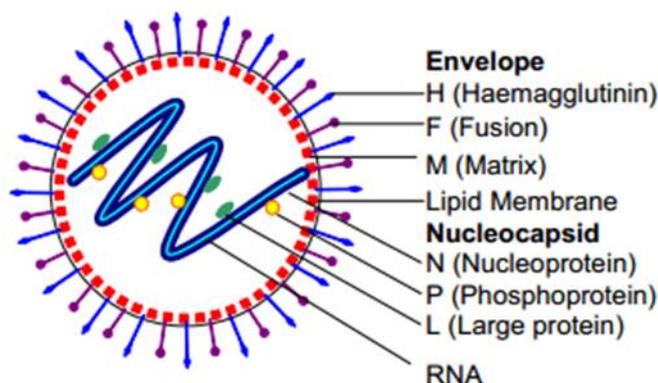


Abb. 1: Schematische Darstellung der Genom und Kapsid Organisation des Masernvirus¹⁴

1.1.3 Invasion, Dissemination und Transmission des Masernvirus

Die Invasion der menschlichen Wirtszelle kann generell über die beiden Rezeptoren CD150, auch SLAM (signaling lymphocyte activation molecule) genannt oder Nectin-4 erfolgen. Der Rezeptor CD150 wird unter anderem auf dendritischen Zellen (DC), hämatopoetischen Stammzellen, Makrophagen sowie T- und B-Lymphozyten exprimiert. Die Infektion des menschlichen Wirts erfolgt aerogen, indem das Virus im oberen respiratorischen Trakt an den CD150-Rezeptor von DC im mukoziliären Epithel bindet und inokuliert wird. Ebenso werden im unteren Respirationstrakt Makrophagen und DC infiziert, welche sich intraalveolär oder in der alveolären Membran befinden¹⁵. Das H-Protein bindet dabei an den Rezeptor der Zielzelle, was eine Aktivierung des F-Proteins bewirkt. Mehrere Änderungen der Konformität des P-Proteins führen zu einer Verschmelzung der Zell- und Virenmembran, sodass eine Pore gebildet wird, über welche das virale Ribonukleokapsid (RNP) in die Wirtszelle gelangt¹⁶. Virale RNA wird nun zu Boten-RNA (mRNA) transkribiert und mittels Translation werden virale Proteine gebildet. H- und F-Proteine werden in die äußere Wirtsmembran eingebaut und dienen der Zell-Fusion. Die weitere Dissemination des Masernvirus erfolgt nun entweder über Transmission des RNP durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder über die Bildung neuer Viren, indem virale Proteine an die Zelloberfläche gelangen und N-Protein vermittelt enkapsiert werden (siehe Abbildung 2).

Nectin-4 ist der epitheliale Rezeptor für das Masernvirus. Er ist auf der basolateralen Seite der Epithelzellen exprimiert und spielt daher für die weitere virale Dissemination eine entscheidende Rolle. Infizierte epitheliale Zellen geben das Virus über Zell-Zell-Kontakte an Nectin-4 positive Zellen weiter. Ebenso können CD150 positive Zellen zirkulieren und weiter entferntes epitheliale Gewebe infizieren. So kann sich das Virus auf andere Organe ausbreiten, in seltenen Fällen auch auf Neuronen, Astrozyten oder Oligodendrozyten.

Die virale Infektion führt im respiratorischen Epithel zu einer Schädigung der zellulären Integrität. Dies induziert Husten und damit die Freisetzung von viralen Partikeln in Form von Aerosolen.

Impfstämme wie der Edmonstonstamm (ED) können neben CD150 und Nectin-4 auch über den Rezeptor CD46 an Zellen binden. CD46 ist auf allen kernhaltigen Zellen vorhanden¹⁷.

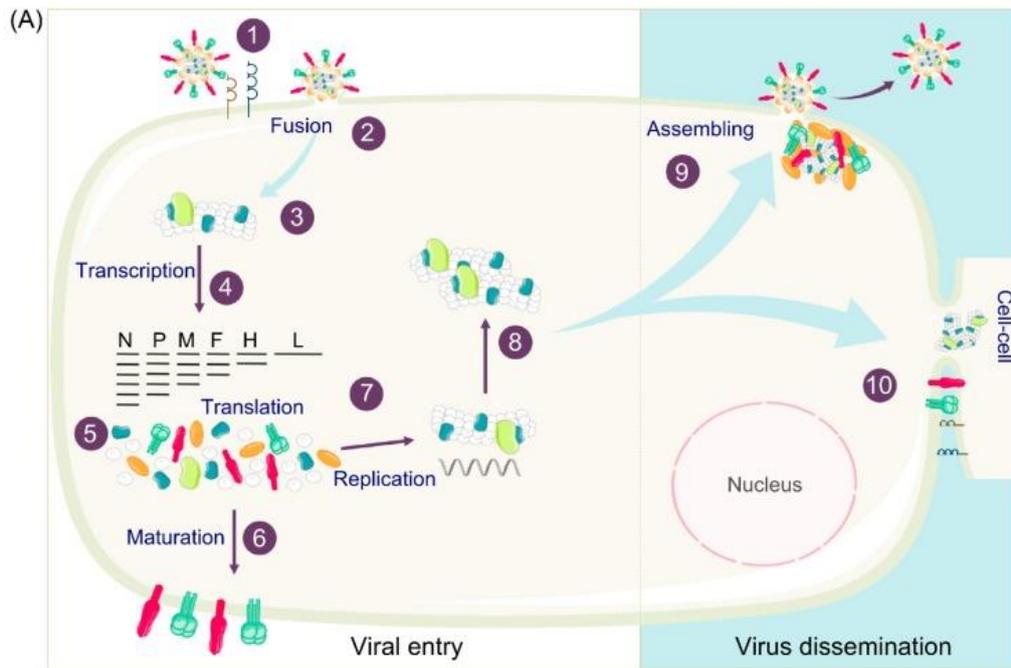


Abb. 2: Schematische Darstellung der Invasion und Transmission des Masernvirus¹⁸

(A) Das Virus bindet über das H-Protein an die Wirtszellen (1) und fusioniert F-Protein vermittelt (2). Die genetische Information gelangt in das Zytoplasma (3) und wird in mRNA transkribiert (4). Durch Translation entstehen virale Proteine (5), welche an die Zelloberfläche transportiert werden (6). Auch die Replikation von positiv-strängiger RNA erfolgt im Zytoplasma (7) und dient als Vorlage für die Synthese negativ-strängiger RNA (8). Virale Proteine lagern sich an der Zelloberfläche an und führen entweder zum Ausknospen von neuen Viren (9) oder zur Zell-Zell-Fusion (10).

1.1.4 Die Masernerkrankung

Im Prodromalstadium der Masernerkrankung zeigen sich erkältungsähnliche Symptome wie Husten und Niesen. Dies fördert die Transmission des Masernvirus. Nach einer Inkubationszeit von etwa 9 - 19 Tagen treten Konjunktivitis und Rhinitis auf. Koplik'sche Flecken an der Mundschleimhaut sind in diesem Stadium pathognomonisch, diese präsentieren sich als hellrote, punktförmige Areale mit einem weißen Zentrum. Eine Infektiosität besteht etwa vier Tage vor bis vier Tage nach dem Beginn des charakteristischen Hautausschlages. Dieser zeigt sich einige Tage nach dem Auftreten der Koplik'schen Flecken und zeigt sich typischerweise als makulopapulöses Exanthem, welches von retroaurikulär über den Körperstamm zieht und von hohem Fieber begleitet wird. Gleichzeitig entwickelt sich die erworbene Immunantwort, welche das Virus eliminiert und eine lebenslangen Immunität erzeugt.

Komplikationen, wie die akute und subakute Masernenzephalitis treten zwei Wochen beziehungsweise 1 - 7 Monate nach Erkrankung auf und verlaufen in 20 - 85% der

Fälle letal, da nur eine symptomatische Therapie möglich ist. Hierbei handelt es sich um eine Entzündung des Hirnparenchyms, welche häufig mit der Symptomtriade hohes Fieber, Kopfschmerzen und Bewusstseinsbeeinträchtigung einhergeht. Da diese Symptome auch bei einer systemischen Infektion auftreten, wird die Masernenzephalitis häufig verspätet diagnostiziert. Die akute Masernenzephalitis tritt meist auf während der Hautausschlag noch besteht, und ist eine direkte Invasion mit Replikation des Masernvirus in den Zellen des Zentralnervensystems¹⁹.

Die subakute Masernenzephalitis ist bis dato nicht vollständig verstanden, man geht jedoch von einer Infektion des Zentralnervensystems aufgrund einer molekularen Mimikry aus. Hierbei reagieren Antikörper mit einem Myelinprotein und führen zu einer sterilen Infektion des Zentralnervensystems.

Die Einschlusskörperchen Enzephalitis (MIBE) ist eine Spätkomplikation, an welcher in der Regel nur immunsupprimierte Patienten innerhalb eines Jahres nach Maserninfektion erkranken. Der typische Hautausschlag tritt aufgrund der beeinträchtigten T-Zell-Funktion nicht oder nur vermindert auf. Das Virus persistiert jedoch im Körper und Virenantikörper können mit zunehmendem Krankheitsprozess im Liquor mit steigender Konzentration nachgewiesen werden. Der direkte Virusnachweis über Virus RNA gelingt mittels Hirnbiopsie. Die Letalität liegt bei 75 %²⁰.

Eine Spätkomplikation ist die Subakute Sklerosierende Panenzephalitis (SSPE), eine „slow-virus infection“ die nach 1 - 10 Jahren auftritt und wahrscheinlich aufgrund intrathekaler Viruspersistenz zu einer demyelinisierenden, generalisierten Gehirnentzündung führt. Der Ausgang der SSPE ist immer letal¹⁰.

1.2 Das Immunsystem

Ubiquitäre Pathogene wie Bakterien, Viren und Pilze bilden eine tägliche Herausforderung für den menschlichen Organismus. Über Jahrtausende hat die Evolution zur Entwicklung des komplexen Immunsystems geführt, welches den menschlichen Organismus vor Infektionen schützt und bestehende Infektionen bekämpft. Verschiedene Mechanismen, wie die unspezifische Immunabwehr, schützen sofort beim Kontakt mit Krankheitserregern oder eliminieren gezielt bekannte Pathogene, eine Aufgabe der erworbenen Immunität. Das Immunsystem ist lernfähig und gegenüber dem eigenen Organismus tolerant.

1.2.1 Die unspezifische Immunabwehr

Die unspezifische beziehungsweise angeborene Immunabwehr beginnt bereits mit Eintreten des Erregers in den Organismus und ist damit die erste Immunantwort des menschlichen Körpers. Ein vorheriger Kontakt mit dem Erreger muss nicht bestanden haben. Fremde Zellen werden erkannt, bekämpft und die angeborene Immunantwort aktiviert, um eine schnelle und effektive Kontrolle der Infektion zu erreichen. Die Erkennung nicht körpereigener Zellen oder Proteine erfolgt über konservierte Pathogen-assoziierte molekulare Muster (PAMP). Diese haben sich evolutionär bewährt, da sie spezifisch bei Krankheitserregern vorkommen. Sie werden von mustererkennenden Rezeptoren (PRR) erkannt, welche sich in oder auf der Oberfläche von Immunzellen befinden²¹.

Das angeborene Immunsystem kann in drei Klassen eingeteilt werden. Mechanische und physiologische Barrieren, zelluläre Bestandteile und die humorale Immunantwort. Mechanische Barrieren wie die Haut oder physiologische wie die Magensäure oder Speichelenzyme hindern Krankheitserreger am Eindringen in den menschlichen Körper²². Zelluläre Bestandteile der unspezifischen Immunabwehr sind zum Beispiel Makrophagen, natürliche Killerzellen und Granulozyten. Diese zirkulieren im Blut und können in das Gewebe einwandern. Dort werden Krankheitserreger durch Phagozytose eliminiert und weitere Immunzellen durch das Ausschütten von Zytokinen angelockt. Die humorale Immunantwort besteht aus Plasmaproteinen. Darunter sind Interleukine, welche Immunzellen zur Ausreifung, Aktivierung oder Teilung bringen. Ebenfalls der humoralen, unspezifischen Abwehr zugehörig ist das Komplementsystem. Etwa 30 Plasmaproteine sind beteiligt und können über drei verschiedene Kaskaden aktiviert werden. Das Resultat ist der sogenannte „Membranangriffskomplex“. Dieser bildet eine Pore in der anzugreifenden Zelle, stört die Zellintegrität und führt damit zur Lyse der Zelle. Weitere Funktionen des Komplementsystems sind Opsonisierung und Verstärkung der Immunantwort^{23, 24}.

1.2.2 Die spezifische Immunabwehr

Die Aufgabe der spezifischen Immunabwehr ist es, Erreger zu erkennen und gezielt und effektiv zu eliminieren. Beteiligt sind hieran T- und B-Lymphozyten, welche im Knochenmark gebildet werden. B-Lymphozyten verbleiben zunächst im Knochenmark um dort heranzureifen und werden anschließend in die Blutbahn freigesetzt. T-

Lymphozyten migrieren über die Blutbahn in den Thymus und bilden Oberflächenrezeptoren aus. Über negative Selektion werden alle T-Lymphozyten eliminiert, die auf körpereigene Proteine reagieren.

B-Lymphozyten wandern in sekundär lymphatische Organe und werden durch Kontakt mit Antigenen aktiviert, indem sie diese Antigene aufnehmen, prozessieren und über MHC-II Moleküle (Haupthistokompatibilitätskomplexmolekül) präsentieren. Diese werden von T-Helferzellen erkannt, welche die B-Lymphozyten mit Hilfe von Zytokinen vollständig aktivieren. Nun erfolgt eine starke Proliferation. Die aktivierten B-Lymphozyten differenzieren zu Plasmazellen, die Antikörper sezernieren. Einzelne aktivierte B-Lymphozyten werden zu Gedächtniszellen. Diese stehen bei erneutem Kontakt mit dem gleichen Erreger für eine prompte Immunantwort bereit, indem sie wesentlich schneller Antikörper produzieren.

T-Lymphozyten können als CD4 positive T-Helferzellen mit professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APC) kommunizieren und B-Lymphozyten aktivieren. Die CD8 positiven zytotoxischen T-Lymphozyten hingegen erkennen infizierte Körperzellen über die Präsentation von Antigenen an MHC-I Molekülen und führen zu ihrer Apoptose.

1.2.3 Humane dendritische Zellen

Bei humanen DC handelt es sich um professionelle, antigenpräsentierende Zellen, die Pathogene aufnehmen, prozessieren und über MHC Moleküle präsentieren. Sie entstehen im Knochenmark aus hämatopoetischen Stammzellen. Bereits hier erfolgt die Differenzierung zu myeloiden und lymphoiden Vorläuferzellen. Aus myeloiden Vorläuferzellen entwickeln sich Monozyten, welche zu undifferenzierten myeloiden DC werden. Weitere DC, die aus myeloiden Vorläuferzellen entstehen, sind interstitielle und Langerhans Zellen. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich aus Monozyten differenzierte DC verwendet.

Plasmazytoide DC sind undifferenzierte DC, welche aus lymphoiden Vorläuferzellen entstehen. Die verschiedenen Untergruppen der DC sind auf unterschiedliche Pathogene spezialisiert, so kann das Immunsystem auf verschiedenste Pathogene spezifisch reagieren²⁵.

Es bestehen verschiedene Aktivierungsgrade der DC, die von der jeweiligen Aufgabe der Zelle abhängig sind. Unreife DC sind in peripheren Geweben lokalisiert und weisen Oberflächenmoleküle auf, die auf die Erkennung und Aufnahme von Pathogenen

spezialisiert sind. Während der Prozessierung der Pathogene erfolgt die Differenzierung der DC. Es ändert sich unter anderem das Chemokinrezeptorrepertoire. Diese Veränderung führt zu einer Migration der DC aus dem peripheren Gewebe in die T-Zellareale des lokalen, drainierenden Lymphknotens. Nun dient die Mehrzahl der Oberflächenmoleküle zur Präsentation der Antigene und zur Aktivierung der Immunzellen im lymphatischen Gewebe, neue Antigene können nicht mehr aufgenommen werden. Chemokine und inflammatorische Zytokine, wie die Interleukine (IL) 6,8,12 und 18, werden produziert. Ebenso zeigen sich morphologische Veränderungen, die Zellen besitzen nun die charakteristischen dendritischen Fortsätze. So stellen DC die Brücke zwischen angeborenem und erworbenem Immunsystem dar²⁵.

Durch die DC-Ausreifung nimmt die Expression typischer Oberflächenmarker wie CD1a oder CD150 zu, der für Monozyten charakteristische Marker CD14 nimmt ab. Über den CD150-Rezeptor können die unreifen DC mit dem MV infiziert werden. Impfstämme des MV können zusätzlich durch den CD46-Rezeptor in die Wirtszelle eindringen¹⁷. CD46 ist auf allen kernhaltigen humanen Zellen vorhanden, da dieser Rezeptor der Interaktion mit dem Komplementsystem dient. Eine erfolgreiche Infektion von DC konnte sowohl durch Wildtypviren wie Wildtyp-Fleckenstein (WTF), als auch durch Impfstämme wie ED nachgewiesen werden²⁶.

Für die Verwendung bei *in vitro* Experimenten müssen DC aus Vorläuferzellen mittels Ausreifung gewonnen werden, da sie im peripheren Blut nur in sehr geringer Konzentration zu finden sind und daher schwer isoliert werden können. Für diese Arbeit wurden DC aus Monozyten des peripheren Blutes (PBMC) differenziert, welche aus dem Blut von Blutspendern isoliert wurden. Unter Zugabe von IL-4 und Granulozyten-Makrophagen-Kolonie-stimulierenden-Faktor (GM-CSF) wurden die gewonnenen Monozyten für 6 Tage inkubiert. Nun handelt es sich um unreife DC, welche die typische Morphologie und spezifische Oberflächenmoleküle aufweisen²⁷. Werden proinflammatorische Zytokine in die Kultur gegeben, hier Lipopolysaccharid (LPS), reifen die DC aus. Eine Infektion dieser durch das MV ist nun möglich.

1.2.4 THP-1-Zelllinie

Die THP-1-Zelllinie wurde aus dem peripheren Blut eines 1-jährigen Patienten gewonnen, welcher an einer monozytären Leukämie erkrankt war. Daher ähnelt sowohl die Funktion als auch die Morphologie dem der primären Monozyten und Makrophagen. Die Zelllinie wird in Experimenten häufig verwendet, um die humane Immunantwort zu

untersuchen²⁸. Eine Exposition der THP-1-Zellen mit 4-Methoxyamphetamin (PMA) für 72 h führt zu einer Differenzierung eines Makrophagen ähnlichen Phänotyps sowie zu einer Induktion der Expression von CD14 Rezeptoren. Nun entspricht auch die Antwort mit IL-1 α und Tumornekrosefaktor- α (TNF- α) dem von PBMC²⁹. Oberflächenmarker von Makrophagen bilden sich vermehrt, wenn im Anschluss eine Inkubation für 24 h in einem Nährmedium ohne PMA erfolgt. Die so behandelten THP-1-Zellen können nun mit dem Masernvirus infiziert werden³⁰. Die Simulation einer Infektion mittels Stimulation durch LPS ist ebenfalls möglich. Bereits nach einer Stunde Inkubationszeit zeigt sich eine verstärkte Aktivität der Zellen durch eine veränderte Chemokin- und Zytokin-Antwort. Die Reaktion der THP-1-Zelllinie auf die Stimulation mit LPS zeigt sich sehr ähnlich zur der von aus PBMC gewonnenen Makrophagen und kann daher als Zellmodell verwendet werden³¹.

1.2.5 Der STING Signalweg

Der STING (Stimulator of Interferone Genes) Signalweg dient der Erkennung von nicht körpereigenen Strukturen und der nachfolgenden Aktivierung des angeborenen Immunsystems. Damit ist er Teil der angeborenen Immunantwort. Fremde intrazelluläre Desoxyribonukleinsäure (DNA) oder Ribonukleinsäure wird von cGAS (zyklische GMP-AMP Synthase) erkannt, welches daraufhin zyklisches GMP-AMP (cGAMP) aus ATP (Adenosintriphosphat) und GTP (Guanosintriphosphat) synthetisiert. Dieses bindet an STING und induziert die Dimerisierung und Translokation des vorher am endoplasmatischen Retikulum (ER) ständigen Proteins. An den perinukleären Mikrosomen bildet sich ein Komplex aus STING und der TANK-Binding-Kinase 1 (TBK1), der STING-TBK-1-Komplex, welcher den Interferon-Regulationsfaktor 3 (IRF3) phosphoryliert und damit aktiviert. Dieser Transkriptionsfaktor migriert nun in den Zellkern und führt zu einer Expression der Typ-I-Interferone (siehe Abbildung 3). Die bekanntesten Vertreter sind Interferon- α und - β (IFN- α/β).

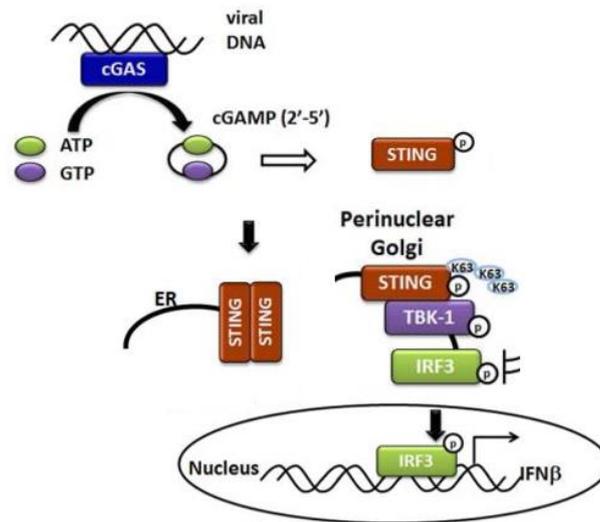


Abb. 3: Schematische Darstellung des cGAS-STING-Signalweges²¹

Virale, intrazelluläre DNA bindet an cGAS, welches nun aktiviert ist und aus ATP und GTP cGAMP synthetisiert. Das am ER gebundene Protein STING wird durch Induktion von cGAMP dimerisiert. Nun kann es zu den perinukleären Mikrosomen migrieren und bildet mit TBK-1 den STING-TBK-1-Komplex. Dieser aktiviert den Transkriptionsfaktor IRF3, welcher nun in den Zellkern transloziert und die Expression von IFN- α und - β auslöst.

1.2.6 Funktion von IFN- β

Das Glykoprotein IFN- β zählt zu den Typ-I-Interferonen. Fast jede humane Zelle kann bei Kontakt mit Pathogenen als Antwort auf die Stimulation von PRR IFN- β bilden³². Dieses bindet an Interferon- α/β -Rezeptoren und führt zur Induktion von Interferon-stimulierten Genen (ISG). Über verschiedene Mechanismen führen diese nun zur Hemmung der viralen Replikation. Auch in angrenzenden Zellen kann ein antiviraler Effekt gezeigt werden, der eine Infektion der Zelle verhindert. Darüber hinaus führt IFN- β auch zur Ausdifferenzierung von DC und zur Reifung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen. Damit hat es eine wichtige immunregulatorische Wirkung. Auch eine direkte antibakterielle Wirkung konnte gezeigt werden, da das Wachstum des Bakteriums gehemmt wird³³.

Fast jedes Virus hat Mechanismen entwickelt, die IFN- α/β Kaskade zu beeinflussen und damit die Expression von ISG zu verhindern oder zu vermindern³⁴. Hieran zeigt sich die entscheidende Rolle der ISG und damit auch des STING/Interferon-Signalwegs an der Inhibierung einer viralen Infektion.

1.3 Ziel der Arbeit

Studien an Makakengewebe zeigten keine beziehungsweise nur eine gering gesteigerte Typ-I-Interferonantwort auf eine MV-Infektion im Vergleich zu nicht infizierten Zellen³⁵. An anderen RNA-Viren, wie dem Influenza-A Virus, konnte festgestellt werden, dass der STING-Signalweg durch das Virus selbst direkt beeinflusst und unterbrochen wird³⁶. Dies wirft die Frage auf, ob auch das MV die Synthese von STING negativ beeinflusst und damit die antivirale Wirkung der Interferone vermindert.

Die vorliegende Arbeit soll den Einfluss einer Masernvirus-Infektion sowohl mit den Viruswildtypen WTF und Berlin (Ber), als auch dem Impfstamm ED auf die STING-Produktion untersuchen. Hierzu werden aus Spenderblut extrahierte und zu humanen DC ausdifferenzierte Zellen mit den Masernstämmen bzw. mit einer Kontrollpräparation ohne infektiöse Partikel infiziert und anschließend mittels Reverser-Transkriptase-Polymerasekettenreaktion (RT-PCR) hinsichtlich der Ausprägung der STING-Expression untersucht.

Ebenso wird die Zelllinie THP-1 infiziert und mittels Western Blot (WB) die STING-Translation sowie mittels antikörperbasiertem Nachweisverfahren (ELISA) die IFN- β -Ausschüttung untersucht.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Material

2.1.1 Biologische Materialien

Das Spenderblut zur Gewinnung der humanen DC wird von der Blutbank des Deutschen Roten Kreuzes in Mannheim zur Verfügung gestellt. Die THP-1 Zellen werden über die Cell line Service GmbH bezogen. Die Virusstämme ED und WTF werden freundlicherweise von Frau Prof. Dr. Schneider-Schaulies aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie in Würzburg und der Wildtypstamm Ber von Frau Prof. Dr. Annette Mankertz vom Referenzzentrum für Masern, Mumps, Röteln des Robert-Koch Instituts in Berlin zur Verfügung gestellt. Die Vero- und VerohSLAM-Zellen werden von Sigma-Aldrich bezogen. Hierbei handelt es sich um eine Zelllinie der Niere von grünen Meerkatzen. Die VerohSLAM-Zellen besitzen den CD150-Oberflächenrezeptor zur Aufnahme von MV.

2.1.2 Antikörper (AK)

Name	Verdünnung	Hersteller
Immunfluoreszenz-Färbung (IF)		
ED-F: rabbit (rb)	1/100	Molecular Probes
ED-H: mouse (ms)	1/10	Molecular Probes
ED-P: ms	1/200	Molecular Probes
Sekundäre AK:		
Anti-ms-594	1/1000	Molecular Probes
Anti-rb-594	1/1000	Molecular Probes
Durchflusszytometrie (FACS)		
CD14 (human(hu)-FITC): ms	1/50	Miltenyi Biotec
CD1a (hu-PE): ms	1/100	BD Biosciences
mSlgG2a: ms-FITC	1/500	BD Biosciences
mSlgG1: ms-PE	1/200	Santa Cruz Biotechnology

Western Blot

MV-F: rb	1/200	Bioss
MV-P: ms	1/1000	abcam
STING: rb	1/1000	abcam
Aktin: ms	1/10000	Sigma-Aldrich
Sekundäre AK:		
Anti-rb-HRP	1/3000	DAKO
Anti-ms-HRP	1/3000	DAKO

2.1.3 Chemikalien

Agarose	Invitrogen
Bovines Serumalbumin (BSA)	Sigma-Aldrich
Bromphenolbau	Sigma-Aldrich
Ethidiumbromid	Roth
Ethylendiamintetraessigsäure (EDTA)	Sigma-Aldrich
FACS Flow	BD Biosciences
FACS Rinse	BD Biosciences
Fetales Kälberserum (FKS)	Thermo Scientific
GeneRuler 1kb (#SM0311)	Fermentas
GM-CSF	Miltenyi Biotec
H ₂ O	Millipore Q
Humanes IL-4	Miltenyi Biotec
Ladepuffer PCR (#B70248)	BioLabs
LPS	Sigma-Aldrich
Lymphozytenseparationsmedium (LSM)	PromoCell
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich
Penicillin/Streptomycin	Sigma-Aldrich
Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS)	Sigma-Aldrich
PMA (PK-CA577-1544-5)	PromoCell
RPMI-1640	Sigma-Aldrich

2.1.4 Verbrauchsmaterialien

CD14 Microbeads	Miltenyi Biotec
-----------------	-----------------

Cryos	Greiner Bio-One
Eppendorfgefäße (1,5 und 2 ml)	Eppendorf
FACS Küvetten	Falcon
MACS-Separationssäulen	Miltenyi Biotec
Mikroreaktionsgefäße	Eppendorf
Petrischalen Nunc	Thermo Scientific
Pipettenspitzen	Eppendorf
Stickstoff	Broser
Zellkulturflaschen CELLSTAR	Freiner Bio-One
Zellkulturplatten	ThermoScientific

2.1.5 Kits

Cytofix/Cytoperm Kit	BD
DuoSet ELISA Human IFN- β (DY814-05)	R&D Systems
RNeasy Kit #74104	QIAGEN
RT-PCR Kit #210210	QIAGEN

2.1.6 Geräte

Viruszucht und Zellkultur

Sicherheitswerkbank	Hera Safe	Heraeus Instruments
Inkubator	Function Line	Heraeus Instruments

RNA-PCR

PCR-Reader	Biometra
Nanophotometer P330	IMPLEN
Gelelektrophorese Block	BioRad
Blotkammer	BioRad

Zellysat Präparation

Zentrifuge	Biofuge Stratos	Heraeus Instruments
Tischzentrifuge	Mikro 22R	Hettich Zentrifugen
Mikroskop	Labovert FS	Leica
Mikroskop	DM LS	Leica

Neubauer Zählkammer Brand

Western Blot

Gelelektrophorese Block	Mini Trans Blot	BioRad
Generator	Model 200/2.0	BioRad
Blotkammer	Fastblot B34	Biometra
Generator	Power Pac 1000	BioRad
Kamera	ECL Chemocam	INTAS

ELISA

Plattenleser	Spark 10 M	Tecan
--------------	------------	-------

Immunfluoreszenzfärbung

Deckgläschen	Micro Cover glasses	VWR
Objektträger	50 Microscope Slides	R. Langenbrinck
Mikroskop	DM RB	Leica
Kamera	Orca flash 4.0 LT	Hamamatsu
Kamera	DFC 420	Leica
Mikroskop	DM 2500	Leica
Blende	EL-6000	Leica

2.1.7 Software und Computerprogramme

Flow Jo	Flow Jo LLC
Graph Pad Prism	Graph Pad Software
Image J	Open source Programm
Cell Quest Pro	BD Biosciences
Microsoft Excel	Microsoft Corporation

2.1.8 Puffer

Radioimmunpräzipitationspuffer (RIPA) (5x)

Tris HCl pH 7,4	100 mM
NaCl	1,5 M
Natriumdesoxycholat	5 %

Triton X-100	5 %
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	0,5 %

Laemmli Puffer (5x)

Bromphenolblau	14,4 mg
Glycerin	479,6 mM
SDS	19,8 mM
Tris HCl pH 6,8	1 M
Mercaptoethanol	0,358 mM

Trenngel

Aqua dest.	15,8 ml
30 % Acrylamidlösung	12,8 ml
Tris pH 8,8	10 ml
SDS 10 %	400 µl
Ammoniumpersulfat (APS) 10 %	400 µl
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	40 µl

Sammelgel

Aqua dest.	6,8 ml
30 % Acrylamidlösung	1,7 ml
Tris pH 6,8	1,25 ml
SDS 10 %	100 µl
APS 10 %	100 µl
TEMED	10 µl

Towbin Puffer

Tris base	3,03 g
Glycin	14,04 g
Methanol	200 ml
Aqua dest.	auf 1 l auffüllen

TBST Puffer pH 7,5 (10x)

Tris HCl pH8	100 mM
--------------	--------

NaCl	1,5 M
Tween-20	0,5 %
Aqua dest.	Auf 1 l auffüllen

Gelelektrophorese Puffer pH 8,3 (10x)

Tris	250 mM
Glycin	1,92 M
SDS 10 %	10 g/l
Aqua dest.	auf 1 l auffüllen

Blockpuffer

Tween-20	0,2 %
Magermilchpuffer	5 %
Aqua dest.	auf 1 l auffüllen

2.2 Methoden

2.2.1 Zellgewinnung und Zellkultur der DC

Extraktion von PBMC aus humanem Blut

Um PBMC aus humanem Spenderblut zu gewinnen, werden in zwölf 50 ml Röhren je 10 ml LSM vorgelegt. Das Blut (circa 200 ml) wird mit Versene (PBS + 0,5 mM EDTA) auf 360 ml aufgefüllt. Davon werden je 30 ml über das LSM geschichtet. Nun wird bei 300 *g für 30 min bei 4 °C zentrifugiert. Hierdurch werden die unterschiedlichen Blutbestandteile der Dichte nach getrennt. Die untere Fraktion enthält die Erythrozyten, die Interphase die Leukozyten und Thrombozyten und die obere Fraktion das Blutplasma. Die Interphase, auch Buffy Coat genannt, wird abgenommen und mit PBS auf 50 ml aufgefüllt. Nun wird mit 300 *g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und die Zellen in 4 ml PBS (ohne Ca²⁺/ohne Mg) aufgenommen. Es wird erneut für 10 min bei 300 *g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Dieser Vorgang wird so oft wiederholt, bis der Überstand klar ist. Nun wird die Zellzahl mittels Zählung in der Zählkammer nach Neubauer bestimmt.

Selektion CD14-positiver Zellen (Monozyten)

In die Zellsuspension wird je 10^7 Zellen 80 μ l MACS-Puffer und 20 μ l CD14 Magnetic Beads zugegeben. Die Magnetic Beads binden selektiv CD14-Zellen, welche nun mittels Magnetsäule aus einer Zellsuspension selektiert werden können. Die Lösung wird für 15 min auf Eis inkubiert. Zur Vorbereitung werden die MS-Säulen mit je 500 μ l MACS-Puffer gespült. Die Zellsuspension wird mit MACS-Puffer gewaschen und bei 300 *g für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Je $1,5 \times 10^8$ Zellen werden in 500 μ l MACS-Puffer aufgenommen und auf eine MS-Säule, welche sich in einem Magneten befindet, gegeben. Die an Magnetic Beads gebundenen CD14-positiven Zellen verbleiben in der Säule, die übrigen Zellen laufen hindurch und werden verworfen. Nun wird die Säule dreimal mit 500 μ l MACS-Puffer gewaschen, anschließend aus dem Magnet genommen und in ein neues Röhrchen gegeben. 1 ml MACS-Puffer wird nun zum Waschen auf die Säule gegeben. Die selektierten Zellen werden in 4 ml MACS-Puffer gepoolt und gezählt.

Differenzierung zu dendritischen Zellen und Zellkultur

Die CD14-positiven Zellen werden in der gewünschten Konzentration in RPMI-1640, angereichert mit IL-4 und GM-CSF (je 50 U/ml), sowie 10 % FKS und Penicillin/Streptomycin aufgenommen und in 3 ml Medium je Loch in 6-Loch-Platten ausgesät. An Tag 2 oder 3 und an Tag 5 erfolgt ein Mediumwechsel. Dafür wird aus jeder Vertiefung 1 ml Medium entnommen und bei 300 *g für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wird verworfen und das entstandene Zellpellet wird in 1 ml frischem Kulturmedium (RPMI-1640, 10 % FKS, IL-4 und GM-CSF je 150 U/ml) resuspendiert und in das ursprüngliche Well zurückgegeben. Die Differenzierung der DC wird mittels FACS-Analyse der Oberflächenmarker CD14 und CD1a an Tag 0 und Tag 6 überprüft (siehe Abbildung 4).

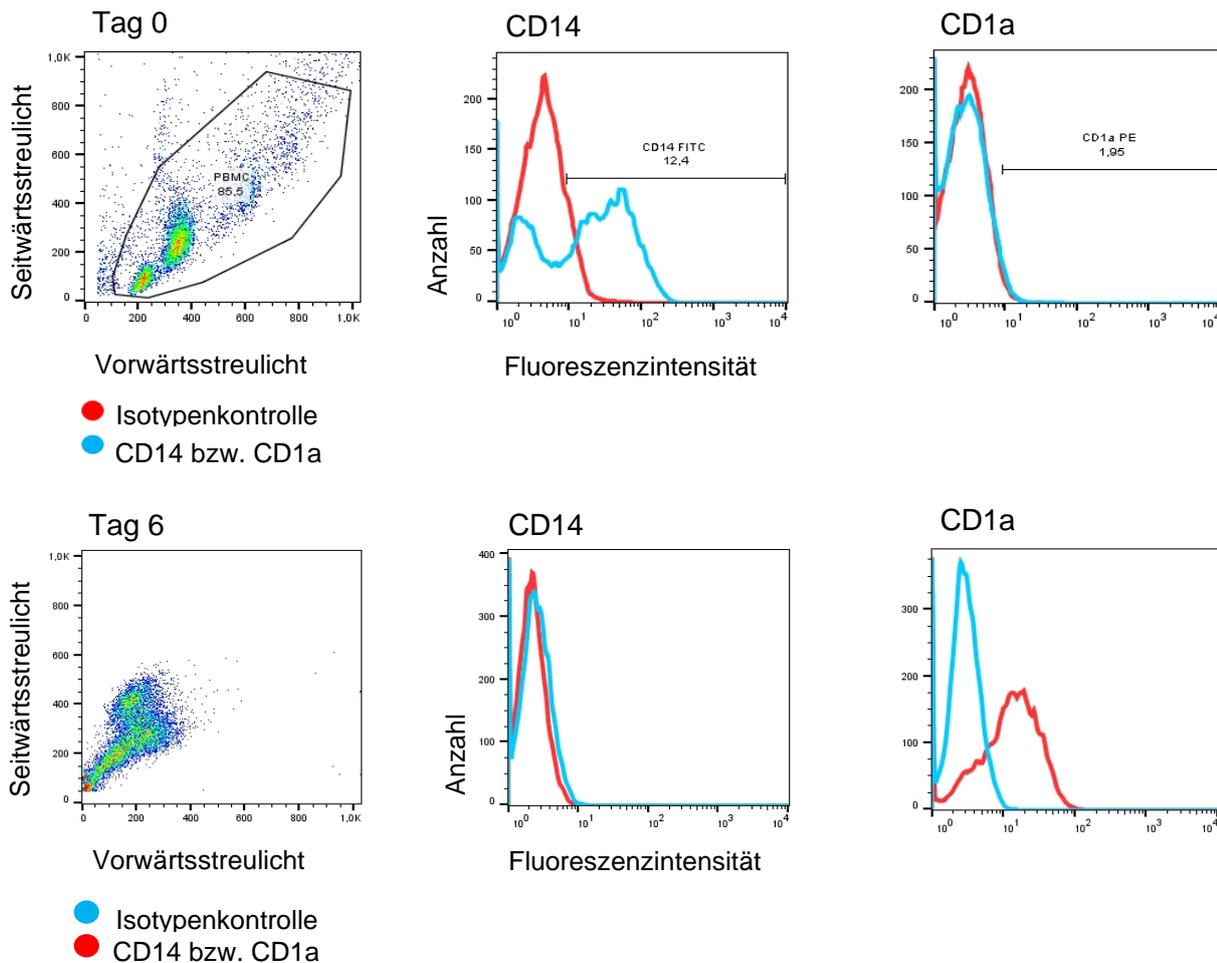


Abb. 4: FACS-Analyse der unreifen DC an Tag 0 und Tag 6 mit Immunfluoreszenzfärbung der Oberflächenmarker CD14 und CD1a

2.2.2 Zelldifferenzierung und Kultur der THP-1-Zellen

Die THP-1-Zellen werden mit einer Dichte von 1×10^5 pro Vertiefung in einer 96-Loch-Platte mit 220 ng/ml PMA und 200 μ l vorgewärmten Medium je Loch ausgesät. Das Medium besteht aus THP-Medium mit 10 % FKS und Penicillin/Streptomycin. An Tag 3 werden die THP-1-Zellen dreimal mit 150 μ l vorgewärmten Medium ohne PMA gewaschen. An Tag 4 erfolgt die Infektion nach Punkt 2.2.5. jeweils in Triplikaten. Das Virus wird in einem Verhältnis von 5, 0,5 und 0,05 pro Zelle hinzugegeben. Dies ist die Multiplizität der Infektion (moi). Die Stimulation mit Poly i:C, LPS und 2'3'cGAMP wird 2 Stunden nach Infektion durchgeführt.

2.2.3 Virusanzucht

Zum Anzüchten des Impfstammes Edmonston werden Vero-Zellen verwendet. Hierbei handelt es sich um eine Nierenzelllinie der grünen Meeresskatze, welche Fibroblasten ähnelt und für die Virusanzucht etabliert ist. Zum Anzüchten der Wildtypstämme WTF und Berlin werden VerohSLAM-Zellen verwendet, da diese den CD150-Rezeptor exprimieren. Es werden 10 große Kulturflaschen mit je etwa 2×10^4 Zellen mit einer *moi* von 0,01 und Zellmedium ohne FKS für eine Stunde bei 37 °C infiziert. Anschließend wird das Infektionsmedium verworfen und die Zellen mit FKS-haltigem Medium bei 37° kultiviert. Nach etwa 2 - 3 Tagen ist ein deutlicher zytopathischer Effekt (CPE) als Nachweis einer Infektion zu sehen. Nun wird das Medium verworfen, auf jede Zellkulturflasche 3 ml PBS gegeben und diese bei -20 °C eingefroren. Schwimmen bereits viele Zellen ab, wird das Medium bei 1500 Umdrehungen pro Minute (rpm) für 5 min zentrifugiert und das Zellpellet mit einer angemessenen Menge PBS ebenfalls bei -20 °C eingefroren. Um die Viren zu gewinnen, werden die Flaschen langsam auf Eis aufgetaut und die Zellen mit einem Zellschaber gelöst. Diese werden in vorgekühlten 50 ml Tubes gepoolt, durchmischt und für 15 min bei 3000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

2.2.4 Virustitration

Der Virustiter wurde nach der TCID₅₀ (Tissue Culture Infectious Dose) bestimmt. Dies ist die Verdünnung des Virusstocks, welche ausreicht, um 50 % aller Zellen in einer Zellkultur zu infizieren. Die entsprechenden Zellen (hier Vero/VerohSLAM) werden einen Tag zuvor mit 1×10^4 Zellen je Well ausgesät. Eine Verdünnungsreihe des Virusstocks bis 10^{-7} wird angesetzt. Hierzu werden in 7 Mikroreaktionsgefäßen 900 µl Medium vorgelegt und in das erste 100 µl Virussuspension zugegeben. Dieses wird durchmischt und daraus 100 µl entnommen und zu dem zweiten Mikroreaktionsgefäß gegeben. Dies wird wiederholt, bis die Verdünnungsreihe vollständig ist. Das Medium auf den Zellen wird abgenommen und jeweils 100 µl Virussuspension pro Well dazugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Nun wird die Virussuspension verworfen und durch Medium mit 1 % FKS ersetzt. An Tag 3 und 5 wird der CPE mikroskopisch kontrolliert. Die Anzahl der Wells, in welchen sich eine Infektion zeigt, wird herangezogen, um anschließend mit der Formel nach Spearman und Kärber die TCID₅₀ zu bestimmen.

2.2.5 Infektion

An Tag 6 sind die DC ausgereift und können infiziert werden. THP-Zellen können bereits an Tag 4 der Differenzierung infiziert werden. Nachdem die Zellzahl unter Zuhilfenahme einer Neubauerzählkammer bestimmt wurde, wird die gewünschte Anzahl in 10 ml Medium ohne FKS resuspendiert. Das Virus wird nun in einer moi von 0,5 je DC zugegeben und für 1 h bei 37 °C inkubiert. Das positive Kontrollmedium enthält LPS in der Konzentration 1 µg/ml. Bei den Ansätzen mit einer Virusinfektion erfolgt nun ein Mediumwechsel (RPMI-1640, 10 % FKS, IL-4/GM-CSF je 50 U/ml) und die Zellen werden mit $1,5 \times 10^6$ Zellen je Well ausgesät und 24 h lang inkubiert. Zunächst erfolgte der Infektionsnachweis mittels Immunfluoreszenzfärbung 24 h nach Infektion (siehe Abbildung 5), parallel hierzu erfolgte je nach Versuchsaufbau der Infektionsnachweis mittels WB oder RT-PCR.

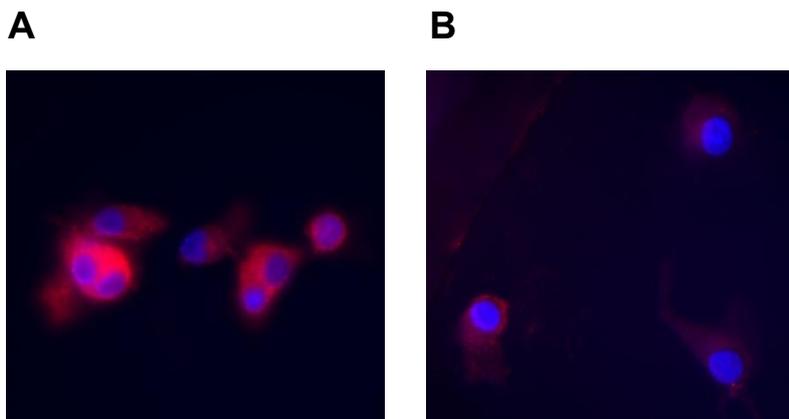


Abb. 5: Immunfluoreszenzfärbung des Masern-F-Proteins sowie des Zellkerns in humanen DC 24 h nach Infektion mit ED (A) oder einer Mock-Präparation (B) zum Nachweis einer erfolgreichen Infektion

2.2.6 PCR

RNA Präparation

Nachdem die Zellzahl bestimmt wurde, wird die Zellsuspension für 5 min bei 300 *g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Bei über 5×10^7 Zellen wird 600 µl RLT-Puffer® zugegeben, sonst 350 µl. Die Lösung wird mindestens fünfmal durch eine 20-gauge Nadel aspiriert, um die Zellen zu lysieren. 350 µl Ethanol werden zugegeben und bis zu 700 µl je Säule aufgetragen. Für 15 s wird bei 8000 *g zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Nun werden erst 700 µl RW1-Puffer® auf die Säule gegeben

und für 15 s bei 8000 *g zentrifugiert und anschließend mit 500 µl RPE-Puffer® für 2 min bei 8000 *g zentrifugiert. Die Säule wird nun in ein Sammeltube überführt. 50 µl RNase freies Wasser wird direkt auf die Membran der Säule aufgetragen und für 1 min bei 8000 *g zentrifugiert. Die Konzentration der gewonnen RNA wird nun photometrisch bestimmt und die RNA bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Reverse Transkription – Polymerasekettenreaktion

Mithilfe der RNA-abhängigen DNA-Polymerase kann einsträngige RNA in komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben werden. Die gewonnene cDNA wird nun unter Zuhilfenahme von Oligonukleotid-Primern amplifiziert.

Je Reaktionstube werden 300 ng RNA zugegeben. Mit RNase freiem Wasser wird die Füllungsmenge auf 35 µl aufgefüllt. Es werden 10 µl Reaktionspuffer, 2 µl Enzyme, 2 µl Basen, 0,5 µl Vorwärts- und 0,5 µl Rückwärtsprimer hinzugegeben. In einem Cycler wird das unten aufgeführte Programm durchgeführt. Die Annealing Temperaturen variieren je nach verwendetem Primer: STING 53 °C/ Aktin 60 °C/ MV-L 68 °C/ IFN-β 53,5 °C.

Primer Sequenzen

Die Primer wurden unter Zuhilfenahme einer Software von Thermo Fisher Scientific GmbH, Ulm, Deutschland konstruiert und von diesem Unternehmen angefertigt.

	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer	Produktlänge	Annealing
Aktin	TGACCCAGATCATGTTTGAGA	ACTCCATGCCAGGAAGGA	456 bp	60 °C
MV-L	TGTA AACGACGGCCAGT	CAGGAAACAGCTATGAC	604 bp	68 °C
STING	CGCCTCATTGCCTACCAG	GCTGCCACAGTAACCTC	108 bp	53 °C
IFN-β	GAAAGGGA- GAAGTGAAAGTGG	TGGAGAAGCACAAACAG- GAG	207 bp	53,5 °C

Cycler Programm

1	50 °C	30:00 min
2	95 °C	15:00 min
3	94 °C	01:00 min
4	53/53,5/60/68 °C	00:30 min

5	72 °C	01:30 min (Schritt 3 - 5: 35 Zyklen)
6	72 °C	10:00 min
7	4 °C	∞

Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient dazu, geladene Moleküle in einem elektrischen Feld der Größe nach aufzutrennen. Die Moleküle werden anschließend im Vergleich zu einem Marker mit bekannter Größe unter ultraviolettem Licht (UV) sichtbar gemacht.

Für das Gießen des Agarosegels wird zu 200 ml TAE Puffer die gewünschte Konzentration Agarose zugegeben (hier 2 %). Die Lösung wird für circa 2 min unter wiederholtem Schwenken erhitzt, bis sich die Agarose vollständig gelöst hat und die Flüssigkeit klar ist. Nach etwa 10-minütigem Abkühlen wird 5 µl Ethidiumbromid zu je 100 ml Gel gegeben. Das Gel wird in die gewünschte Form geschüttet und für etwa eine Stunde auspolymerisiert. Die nachzuweisende DNA wird im Verhältnis 6:1 mit einem Ladepuffer gemischt. Hiervon werden 15 µl je Tasche aufgetragen und 10 µl je Tasche des gewünschten Markers hinzugefügt, um die Anzahl der Basenpaare zu identifizieren. Für circa 60 min wird eine Spannung von 90 V angelegt. Anschließend wird das Gel unter UV-Licht in der GelDoc fotografiert.

2.2.7 Western Blot

Mittels Western Blot können Proteine und Proteinfragmente dargestellt, ihrer Größe nach aufgetrennt und quantifiziert werden.

Proteingewinnung

Je 5×10^6 Zellen werden in 1 ml Lysepuffer lysiert, gut gemischt, für 45 s geschüttelt und für 45 min auf Eis inkubiert. Um die Zelltrümmer zu pelletieren, wird für 20 min bei 4 °C und 13.000 *g zentrifugiert. Der Überstand wird abgenommen und 100 µl Aliquots aus je 80 µl Lysat und 20 µl Lämmli-Puffer hergestellt. Die Aliquots werden bei 95 °C für 5 min gekocht und können nun bei -80 °C gelagert werden.

Gelelektrophorese

Um das Gel zu gießen, wird mit dem Trenngel begonnen. Dieses wird bis 1 cm unter den Kamm eingefüllt. Nachdem dieses auspolymerisiert ist, wird das Sammelgel eingefüllt und der Kamm eingesteckt. Über Nacht polymerisiert dieses aus und kann nun

mit 35 µl Lysat pro Tasche beladen werden. Eine Spannung von 80 V wird angelegt und die Kammer mit Gelelektrophoresepuffer befüllt. Sobald die Proben das Trenngel erreicht haben, wird die Spannung auf 110 V erhöht. Das fertige Gel wird nun auf eine PVDF-Membran geblottet, um die aufgetrennten Proteine auf die PVDF-Membran zu übertragen. Hierzu wird die PVDF-Membran für 30 s in Ethanol und anschließend für 15 min in Blotpuffer äquilibriert. Nun wird das Gel auf die Membran und zwischen je 3 Blättern Whatmanpapier gelegt und mit Towbinpuffer gut befeuchtet. Bei 60 mA wird für 60 min geblottet. Die Membran wird nun mit Blockpuffer für 20 min bei Raumtemperatur (RT) blockiert, um unspezifische Bindungen zu verhindern. Nachdem die Membran mit TBST gewaschen wurde, kann sie mit Antikörpern für je 1 h bei RT oder über Nacht bei 4 °C inkubiert werden. Zwischen jedem Färbeschritt wird dreimal für je 10 min mit TBST gewaschen. Die fertige Membran wird nun mit ECL-Prime™ entwickelt. Hierzu wird Lösung A und B im Verhältnis 1:1 gemischt. Jede Membran wird mit 250 µl der Lösung für 5 min im Dunkeln inkubiert und kann anschließend fotografiert werden.

2.2.8 ELISA

Die IFN-β Konzentration in den Überständen der Zellkulturen wird mit Hilfe des RD-Kits „DuoSet ELISA Human IFN-β“ bestimmt. Wobei die beiliegende Gebrauchsanweisung befolgt wird und alle Antikörper, Standards und Substrate nach Angaben des Herstellers hergestellt und aliquotiert werden.

Über Nacht wird der Coating Puffer bei RT inkubiert. Hierzu wird der Human IFN-β Capture Antibody 1:120 mit dem ELISA Plate-Coating Puffer verdünnt und je Well 100 µl aufgetragen. Am nächsten Tag wird jedes Well dreimal mit 400 µl Waschpuffer (Wash Buffer Concentrate 1:25 in destilliertem Wasser gelöst) gewaschen. Zum Blockieren der unbesetzten Bindungsstellen wird 300 µl Reagent Diluent pro Well für 1 h bei RT inkubiert. Anschließend wird erneut dreimal gewaschen. Es werden 100µl Standard beziehungsweise Probenmaterial in doppelter Ausführung je Well verwendet und für 2 h bei RT inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden 100 µl Detection Antibody je Well pipettiert und für 2 h inkubiert. Erneut wird dreimal gewaschen und 100 µl Streptavidin-HRP hinzugefügt und bei Dunkelheit für 20 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen werden 100 µl Substrate Solution je Well ebenfalls in Dunkelheit für 20 min bei RT inkubiert. Nun wird die Reaktion mit 50 µl Stop Solution je Well unterbrochen und umgehend die Absorption der Proben bei 450 nm in einem ELISA-Lesegerät

ausgelesen. Mit den so bestimmten optischen Dichten können nun anhand der Standardverdünnung die Probenkonzentration errechnet werden. Hierzu wurde die Software Excel genutzt.

2.2.9 Immunfluoreszenzfärbung

Zur Vorbereitung wird je Kammer 100 μl Lysin für 10 min bei RT inkubiert und mit PBS gewaschen. Je Kammer werden 5×10^4 DC in 250 μl Kulturmedium resuspendiert und für 30 – 45 min bei 37 °C inkubiert bis diese wieder die charakteristische Morphologie aufweisen. Nun wird mit PBS gewaschen und für 20 min bei 4 °C mit PFA fixiert. Zum Permeabilisieren wird das BD Cytfix/Cytoperm Kit verwendet. Für 20 min werden die Zellen bei 4 °C mit BD perm permeabilisiert. Jeder Antikörper wird für 60 min inkubiert. Dazwischen wird je dreimal mit BD wash&perm gewaschen. DAPI wird mit 1 $\mu\text{l}/\text{ml}$ für 10 min im Dunkeln bei RT inkubiert. Anschließend wird dreimal mit BD wash&perm und einmal mit destilliertem Wasser gewaschen und eingedeckt.

2.2.10 FACS-Färbung

Die Durchflusszytometrie dient zur Bestimmung verschiedener optischer Eigenschaften einer Zelle. Mittels Vorwärtsstreulicht kann die Größe der Zellen bestimmt werden und mittels Seitwärtsstreulicht die Granularität, die Größe und Struktur des Zellkerns sowie die innere Komplexität. Die relevante Zellpopulation kann separat ausgewählt und weiter analysiert werden. Erfolgt eine Immunfluoreszenzfärbung der Zellen, kann die Intensität dieser Färbung beurteilt werden. Hier wurden verschiedene Rezeptoren angefärbt, um die Ausdifferenzierung der DC zu beurteilen.

Je Färbung werden 5×10^5 Zellen benötigt. Diese werden mit 500 μl FACS Puffer bei 1500 rpm für 5 min zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Die gewünschten Antikörper werden mit dem Zellpellet in Lösung genommen, für 30 min bei 4 °C inkubiert und anschließend erneut mit 500 μl FACS Puffer gewaschen. Nun werden die Proben im FACS gemessen und mittels FlowJo evaluiert. Die Auswertung der Messwerte erfolgt mittels Microsoft Excel und Graph pad Prism.

3 ERGEBNISSE

3.1 Zytopathischer Effekt als Nachweis einer Infektion

Der zytopathische Effekt (CPE) ist eine charakteristische, degenerative Veränderung der Zellmorphologie sowie des Zellverbandes³⁷. Er dient als Nachweis einer erfolgten Infektion. Hierzu werden DC am Tag 6 der Differenzierung und THP-Zellen mit den Virusstämmen für 1 h bei einer moi von 0,5 inkubiert. Anschließend wurde der Virusstock ausgewaschen und die Zellen weiter bebrütet. Nach 2, 6 und 24 h wurden die Zellen unter dem Mikroskop gesichtet.

Viren, die die Zellmorphologie der infizierten Zellen degenerativ verändern, lösen einen CPE aus. Er entsteht durch Zytolyse, durch Bildung von Einschlusskörperchen oder wie bei einer MV-Infektion durch die Verschmelzung zu Synzytien³⁷. Der CPE zeigt sich bei den verwendeten Virusstämmen ED, WTF und Ber bereits 24 h nach Infektion und ist mikroskopisch gut sichtbar. Dies ist beweisend für eine erfolgte Infektion (siehe Abbildung 6).

Wie erwartet, ist in der uninfizierten Kontrolle kein CPE zu sehen (für DC nicht abgebildet).

DC

(A)



(B)



THP-Zellen

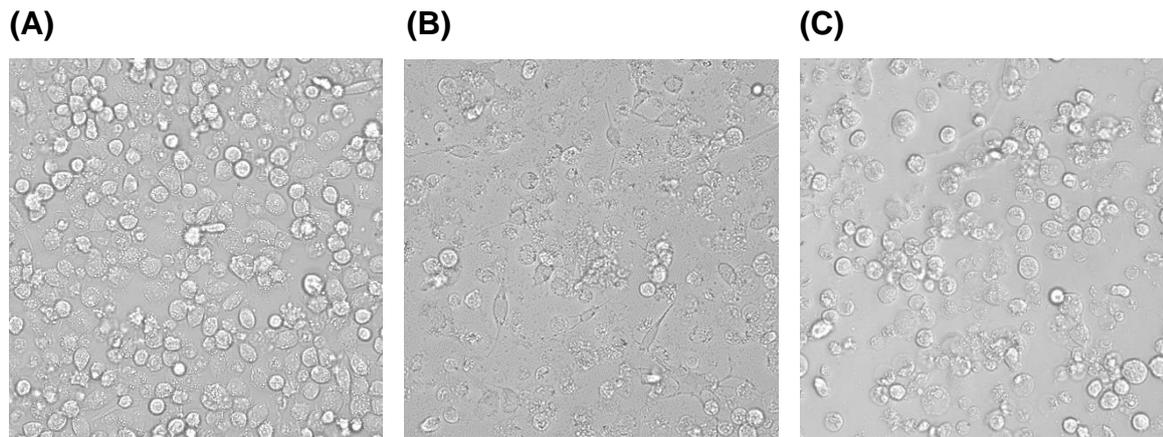


Abb. 6: Durchlichtmikroskopbilder von DC und THP-Zellen 24 h nach Infektion mit ED (A) und Ber (B) mit einer moi von 0,5, sowie von uninfizierten THP-Zellen (C)

3.2 STING Modulation von humanen DC durch das MV

3.2.1 Modulation der RNA-Expression von STING 24 h p.i. durch MV

In dem folgenden Experiment wurden DC von 4 verschiedenen Blutspendern gewonnen und am 6. Tag der Differenzierung mit Wildtyp- und Impfmasternstämmen infiziert. Parallel dazu wurden Zellen mit einer Präparation ohne infektiöse Partikel als Negativkontrolle oder mit LPS behandelt. Das bakterielle Lipopolysaccharid ist einer der Hauptbestandteile der Zellwand gramnegativer Bakterien und stellt einen starken Stimulus für das humane Immunsystem dar. Daher wurde es als Positivkontrolle gewählt. Es wird vom Toll-like Receptor-4 (TLR-4), welcher von jeder DC exprimiert wird³⁸, erkannt und führt eine Inflammation herbei³⁹.

Die RNA-Extraktion erfolgte 24 Stunden post infectionem (p.i.). Mithilfe einer Reverse-Transkriptase-PCR wurde die Expression von STING auf mRNA-Ebene untersucht. Als Infektionskontrolle fand virusspezifische mRNA des Masern L-Proteins und als Ladekontrolle fand β -Aktin Anwendung.

Bei β -Aktin handelt es sich um ein Strukturprotein, welches in jeder DC in etwa gleicher Konzentration vorkommt und daher als Referenz für das Expressionslevel geeignet ist. Die β -Aktin Bande stellt sich wie erwartet homogen dar und wurde zur Normalisierung der Banddichte herangezogen.

Bereits 24 h nach Infektion konnte mittels RT-PCR bei allen verwendeten Virusstämmen mRNA des L-Proteins nachgewiesen werden (siehe Abb. 7). Erwartungsgemäß

war kein Nachweis der mRNA des viralen Gens in den mit uninfektöser Präparation beziehungsweise LPS behandelten Zellen zu finden.

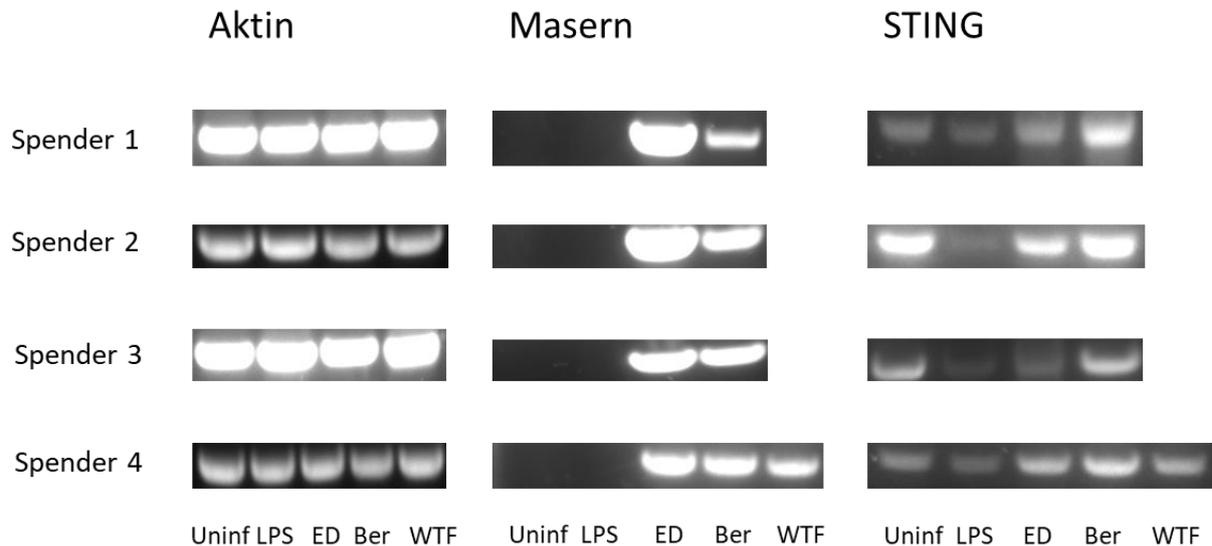


Abb. 7: RT-PCR Produkte der Gene β -Aktin, MV-L und STING von vier Blutspendern Dargestellt sind jeweils die 4 bzw. 5 Ansätze: uninfektöse Kontrolle, LPS-Stimulation und Infektion mit den Virusstämmen ED, Ber und WTF.

Bei allen vier Blutspendern kann eine Verminderung der STING-Expression nach Behandlung mit LPS nachgewiesen werden. Nach Infektion mit dem Impfstamm ED zeigen Spender 2 und 3 eine Reduktion und Spender 1 und 4 eine Induktion der STING-Expression gegenüber der uninfizierten Kontrolle. Nach Infektion mit dem Wildtyp Ber reagieren Spender 1 und 4 mit einer Induktion, Spender 3 mit einer Reduktion und Spender 2 ohne Veränderung in ihrer STING-Expression. Eine Varianz in der Grundexpression von STING kann für die vier Blutspender gezeigt werden.

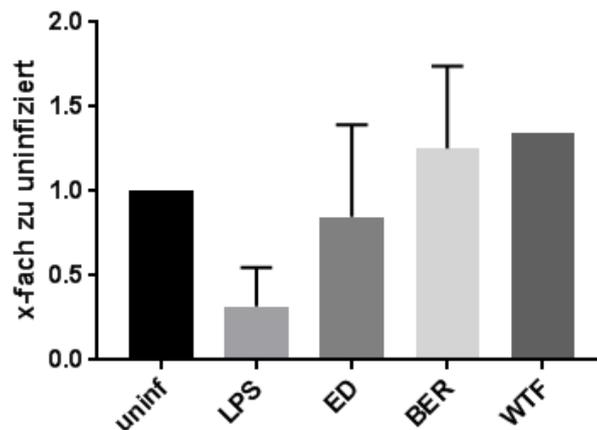


Abb. 8: Banddichte der mittels RT-PCR ermittelten STING-Expression zu β -Aktin normalisiert und über die vier Spender gemittelt

Die uninifizierte Kontrolle wurde hierbei als Referenzwert herangezogen. Eine ANOVA-Analyse (Varianzanalyse) zeigt keine Signifikanz dieser Ergebnisse.

Die gemittelten Banddichten zeigen wie in Abbildung 8 dargestellt eine deutliche Standardabweichung für die STING-Expression nach Infektion mit ED und Ber. Da die Infektion mit WTF nur mit den DC eines Blutspenders durchgeführt wurde, ergibt sich hierfür keine Standardabweichung.

3.2.2 Abnehmende STING-Transkription und -Translation über 2, 6 und 24 h p.I.

Um auch eine Information über die Entwicklung der STING-Expression im zeitlichen Zusammenhang mit der Infektion zu gewinnen, wurden RNA-Proben für eine RT-PCR zu den Zeitpunkten 2, 6 und 24 h p.I. gewonnen. Für diese wurden erneut β -Aktin, das MV-L Protein sowie STING mittels RT-PCR amplifiziert (vergleiche Abbildung 9). Hier zeigen sich erste Amplifikate des MV-L Genomabschnittes bereits zwei Stunden nach der Infektion mit dem Impfstamm ED. Die Expression steigt über die Zeit kontinuierlich an. Auch bei den Wildtypstämmen lässt sich eine Infektion nachweisen, diese ist jedoch bei Ber nicht über die Zeit zunehmend. Bei WTF zeigt sich eine MV-L Bande erstmalig nach Ablauf von 24 Stunden.

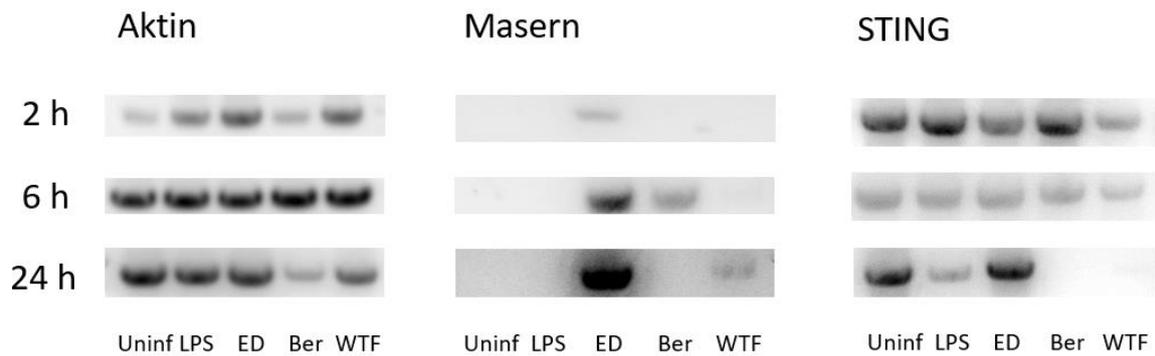


Abb. 9: RT-PCR Produkte von β -Aktin, des Masern-L Proteins sowie STING bei 2, 6 und 24 h p.i. für die Ansätze uninfiziert, LPS stimuliert und infiziert mit ED, Ber oder WTF

Die Expression von STING bei Infektion mit Wildtyp-Masernstämmen zeigt sowohl nach zwei Stunden als auch nach Ablauf von sechs Stunden noch keine deutliche Änderung gegenüber der uninfizierten Kontrolle (siehe Abbildung 10). Der Edmonston-Stamm führt nach 2 h zu einer etwa 1,5-fach erhöhten Menge an STING-mRNA, welche sich dann wieder reduziert. Nach Ablauf von 24 h zeigt sich nun eine deutliche Reduktion für die Viren Ber und WTF, für ED nur ein leichter Rückgang gegenüber der Kontrolle.

Eine Abnahme des STING-Amplifikats nach Stimulation mit LPS ist erst nach 24 h zu beobachten.

Werden nun die Banddichten der STING-mRNA mit denen der entsprechenden β -Aktin-mRNA normalisiert, können die Banddichtewerte trotz unterschiedlicher Zellzahl pro Entnahmezeitpunkt miteinander verglichen werden. Als Referenz wurde jeweils die uninfizierte Kontrolle herangezogen. Nun zeigt sich eine Reduktion im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle bei allen verwendeten Virusstämmen nach 24 h. Ebenso wird eine Reduktion nach Stimulation mit LPS nachgewiesen. 2 h nach Infektion ist ein leichter Anstieg für die Ansätze mit LPS und ED zu finden. Nach 6 h lässt sich jedoch wieder in allen Ansätzen eine Expression, die fast der uninfizierten Kontrolle entspricht, darstellen.

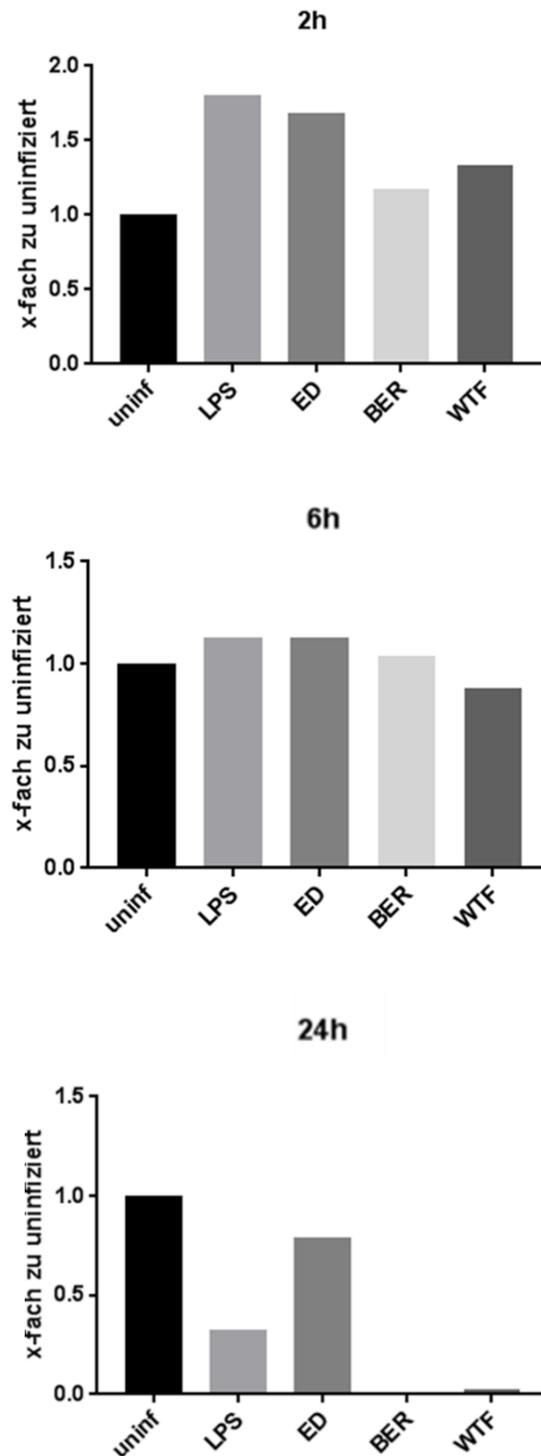
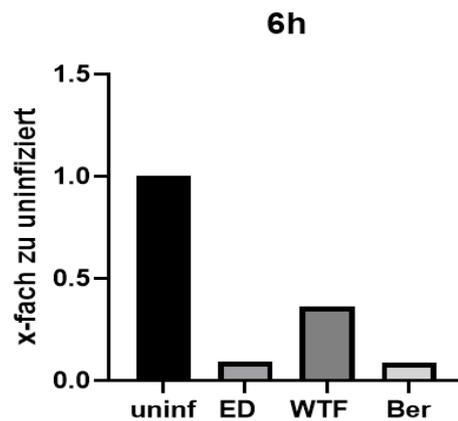
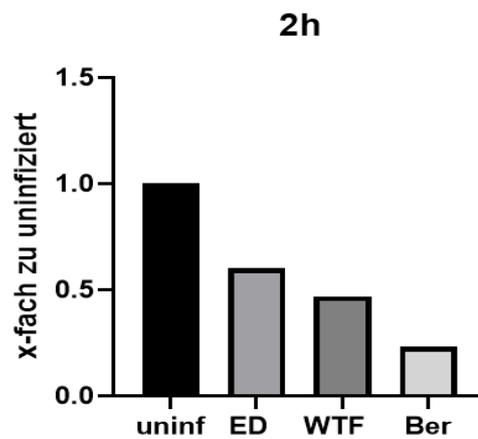


Abb. 10: Gegenüber β -Aktin normalisierte STING Banddichte der RT-PCR nach Entnahmezeitpunkt für die Ansätze uninifiziert, LPS, ED, Ber und WTF
Die uninifizierte Kontrolle wurde hierbei als Referenzwert gewählt.

Zu den oben genannten Zeitpunkten wurden ebenfalls Zelllysate aus derselben Zellkultur von den Ansätzen uninifiziert sowie mit ED, WTF und Ber infiziert gewonnen.

Anschließend wurde ein Western Blot durchgeführt und das Protein STING, β -Aktin und das Masern L-Protein dargestellt.

Wird nun die Translation des STING-Proteins im zeitlichen Verlauf dargestellt (vergleiche Abbildung 11), wird für jeden untersuchten Virusstamm zu jedem Zeitpunkt eine Reduktion gegenüber der uninfizierten Kontrolle sichtbar. Der Virusstamm WTF zeigt eine kontinuierliche Reduktion. Die Virusstämme ED und Ber führen zur stärksten Reduktion 6 Stunden nach Infektion und einen erneuten leichten Anstieg einen Tag nach Infektion.



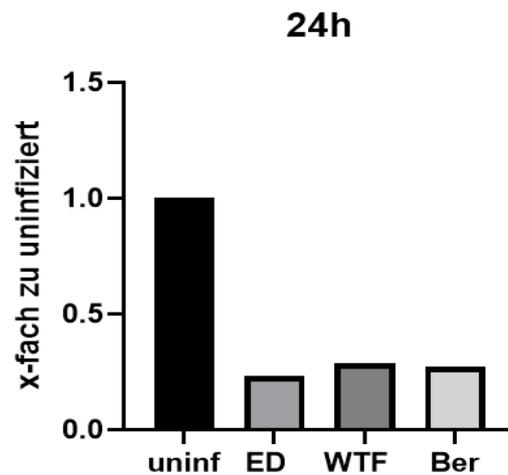


Abb. 11: Banddichte der Darstellung des STING-Proteins mittels Western Blot für die Ansätze ED, WTF und Ber jeweils 2 h, 6 h und 24 h p.I. im Vergleich zur uninifizierten Kontrolle

3.3 Reduktion der STING- und der IFN- β -Konzentration durch Infektion von THP-1 Zellen durch das MV

3.3.1 Reduktion der STING-Expression von THP-1 Zellen 24 Stunden nach Infektion mit dem MV

Eine Vergleichbarkeit der Blutspender war aufgrund der variablen Grundlevel der STING-Expression erschwert. Daher wurden folgende Experimente mit der etablierten Zelllinie THP-1, einer humanen Monozytenzelllinie, wiederholt.

Für die Infektion wurden die Zellen für eine Stunde mit einem Virusstock mit einer moi von 0,5 inkubiert, anschließend gewaschen und weiterhin bebrütet. Auch wurde eine uninifizierte Kontrolle und eine mit 2'3'cGAMP, einem STING-Agonist, stimulierte Zellkohorte bebrütet. Nach 2, 6 und 24 h wurde die RNA gewonnen und mittels RT-PCR untersucht.

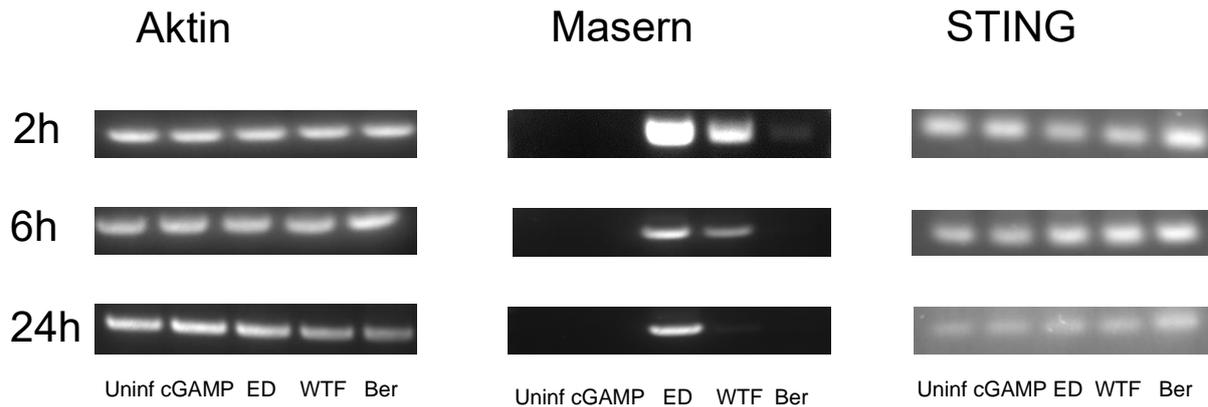
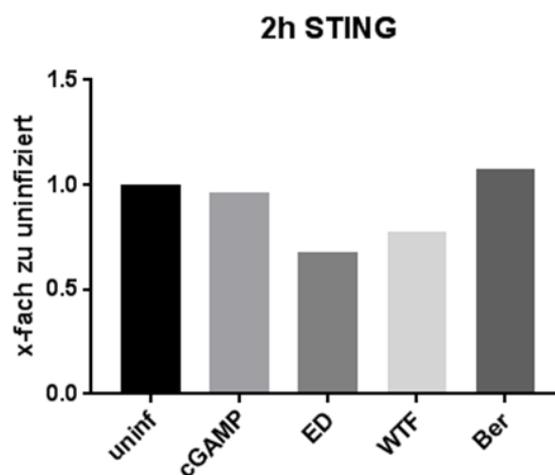


Abb. 12: RT-PCR Amplifikate für THP-1 Zellen 2,6 und 24h p.i.

Dargestellt sind die Ansätze uninferiert als Kontrolle, stimuliert mit cGAMP sowie die Infektionsansätze mit den Virusstämmen ED, WTF und Ber.

Ein guter Nachweis der Infektion kann sowohl für ED, also auch für WTF bereits ab 2 Stunden p.i. abgebildet werden (vergleiche Abbildung 12). Eine Reduktion ist hier für den 24 h Wert bei WTF zu sehen. Für den Ber-Virusstamm wird eine sehr schwache Bande lediglich nach 2 h sichtbar. Die β -Aktinbande ist für alle Zeitpunkte homogen darstellbar und zeigt damit ein gleichmäßiges Einsetzen des Zelllysats. Die STING-Expression ist nur schwach kontrastiert und sollte daher erst anhand der zu β -Aktin normalisierten Banddichten beurteilt werden.



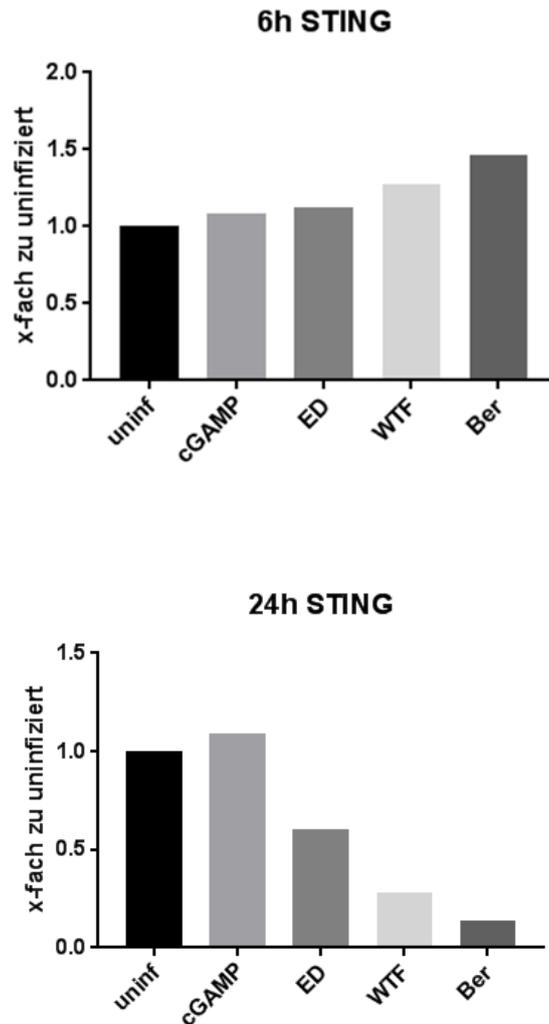


Abb. 13: Dargestellt sind die Banddichten der STING-Banden einer RT-PCR der Ansätze uninifiziert, cGAMP und mit ED, WTF oder Ber infiziert für die Zeitpunkte 2, 6 und 24 h p.i. normalisiert gegenüber β -Aktin

Als Referenz wurde die uninifizierte Kontrolle herangezogen.

Wie bereits bei den von Blutspendern gewonnenen DC, zeigt sich 24 h p.i. ein Rückgang der STING-Expression für alle Virusstämme gegenüber der uninifizierten Kontrolle. Für die Zeitpunkte 2 h und 6 h p.i. ist keine deutliche Veränderung gegenüber der uninifizierten Kontrolle darstellbar. Die hier verwendete Stimulation mit cGAMP führt zu keinem Zeitpunkt zu einer relevante Änderung der STING-Amplifikation (siehe Abbildung 13).

3.3.2 Reduktion des STING-Proteins in einer WB-Kinetik mit 2, 6 und 24 h p.i.

Um auch eine Information über die Translation zu bekommen, wurde der vorherige Versuch unter gleichen Bedingungen erneut durchgeführt. Es wurden zu den Zeitpunkten 2, 6 und 24 h p.i. Zelllysate gewonnen, um einen Western Blot durchzuführen und das Protein STING darzustellen (siehe Abbildung 14).

Für das Impfvirus Edmonston zeigt sich eine kontinuierliche Reduktion der STING-Proteinmenge. Zu jedem untersuchten Zeitpunkt nach Infektion liegt die STING-Proteinmenge niedriger als im Vergleich zu der Proteinmenge der uninfizierten Kontrolle.

Für den Virusstamm WTF liegen ebenfalls alle gemessenen Proteinmengen unterhalb der Kontrolle, jedoch zeigt sich der 24 h-Wert gegenüber dem 6 h-Wert auf das Niveau des 2 h-Wertes erhöht.

Ein erneutes Wiederansteigen nach 24 Stunden ist ebenfalls für das Ber-Virus nachweisbar. Hier ist der 2 h-Wert sogar dem Kontrollwert gegenüber erhöht, der 24 h-Wert liegt wieder unterhalb der uninfizierten Kontrolle.

Hiermit kann erneut bei allen Viren eine Reduktion des STING-Proteins 24 h nach Infektion ermittelt werden.

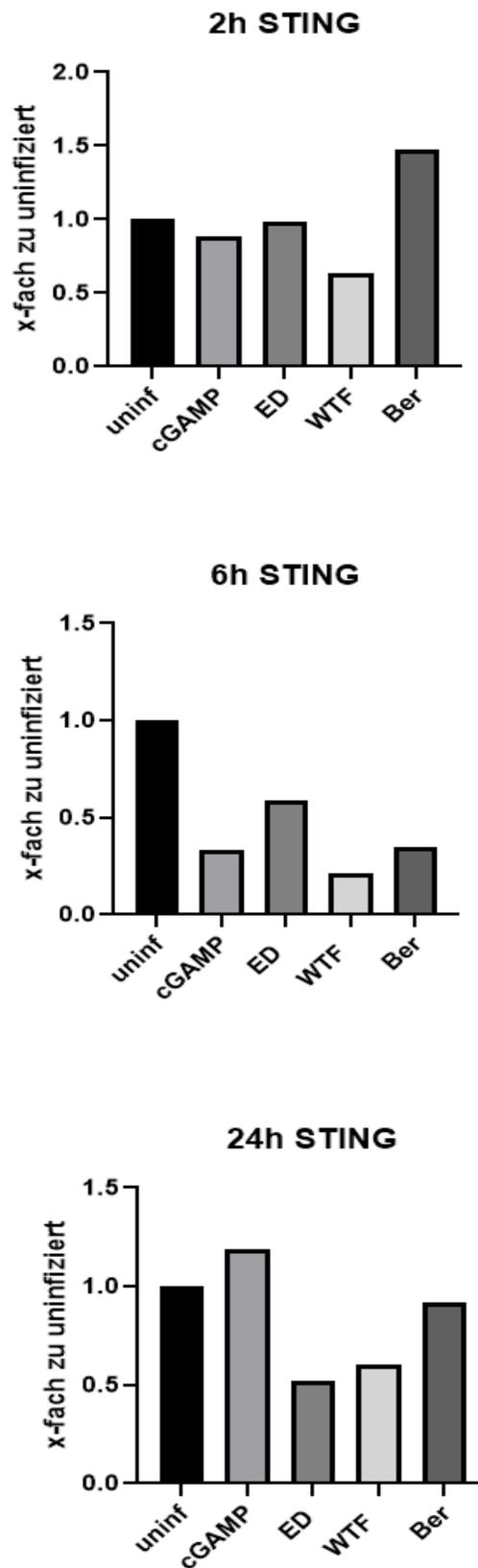
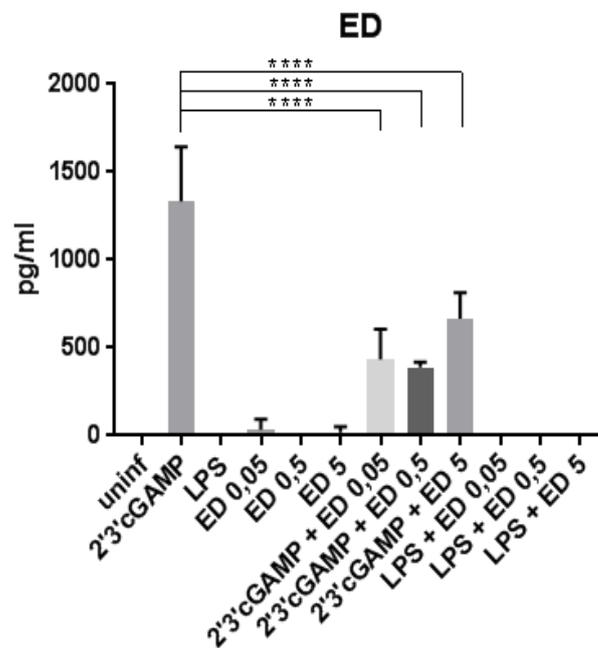


Abb. 14: Banddichten des Western Blots für das Proteins STING nach Infektion mit ED, WTF und Ber in Referenz zu der uninferierten Kontrolle
 Dargestellt sind die Zeitpunkte 2, 6 und 24 h p. l..

3.3.3 Signifikante Reduktion der IFN- β Konzentration nach Infektion und Stimulation von THP-1-Zellen

Eine antivirale Hemmung erfolgt durch die körpereigenen Immunantwort, wenn der STING-Signalweg aktiviert wird und infolgedessen die Stimulation von Interferonen auslöst. Um zu untersuchen, ob die bisher nachgewiesene Reduktion der STING Antwort auch eine Reduktion der Interferonausschüttung zur Folge hat, wurden THP-1-Zellen in Triplikaten mit den drei verschiedenen Virusstämmen und titrierender moi infiziert. Es wurden die moi 5, 0,5 und 0,05 verwendet. Zwei Stunden nach der Infektion wurden die Zellen mit den Stimulanzen LPS oder 2'3'cGAMP behandelt. 24 h p. I. wurden die Überstände abgenommen und ein IFN- β -ELISA durchgeführt (vergleiche Abbildung 15).



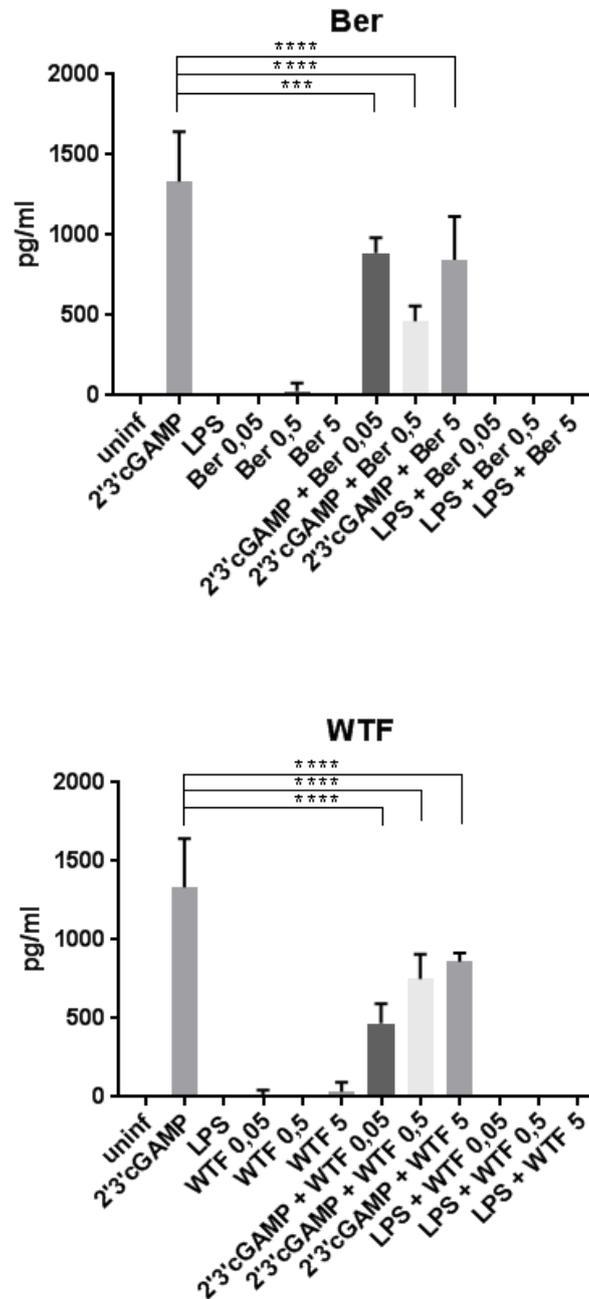


Abb. 15: IFN-β Konzentration im THP-1-Zellkulturmodell nach Infektion mit ansteigender moi

Darstellung des Durchschnitts der Triplikate der IFN-β Konzentrationen der THP-1 Zellen. Es wurde die Infektion mit ansteigender moi (0,05, 0,5 und 5) durchgeführt und die Zellen 2 h p. I. mit den Stimulantien LPS oder 2'3'cGAMP behandelt. 24 h p. I. wurden die Überstände in Triplikaten zur Durchführung des ELISA gewonnen.

Es zeigt sich wie erwartet ein deutlicher Anstieg der IFN-β Konzentration in den mit 2'3'cGAMP stimulierten THP-1-Zellen. Wie oben beschrieben fungiert 2'3'cGAMP als Aktivator des STING-Signalweges. Dies führt zu einem Anstieg der Interferone und

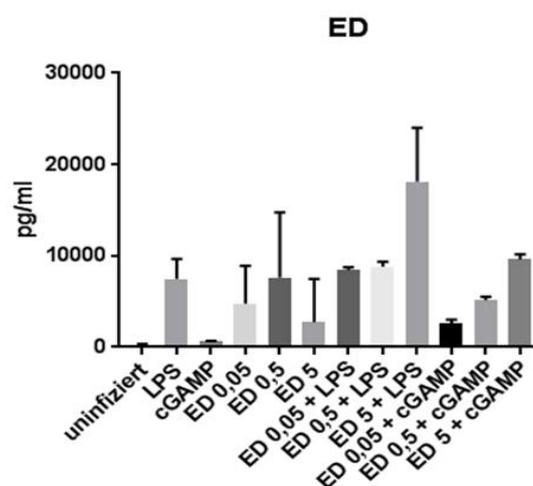
somit auch von IFN- β . Die Stimulation mit LPS oder die alleinige Infektion unabhängig der *moi* führt nach 24 h noch nicht zu einem Anstieg der IFN- β Konzentration im Überstand.

Vergleicht man nun die mit 2'3'cGAMP stimulierten Zellen mit den Zellen, welche infiziert und stimuliert wurden, kann ein hemmender Einfluss auf die durch 2'3'cGAMP stimulierte IFN- β Ausschüttung gesehen werden. Eine ANOVA-Analyse berechnet, dass die IFN- β Konzentrationen hoch signifikant reduziert sind. Die *moi* scheint keinen direkten Einfluss auf das Ausmaß der IFN- β Reduktion zu bewirken.

3.3.4 Die LPS induzierte TNF- α -Sekretion wird durch eine Maserninfektion nicht beeinflusst

Um die Spezifität der Hemmung zu untersuchen, wurden die THP-1-Zellen mit LPS stimuliert und TNF- α mittels ELISA gemessen. TNF- α ist ein inflammatorisches Zytokin, welches vorrangig von aktivierten Makrophagen und T-Lymphozyten ausgeschüttet wird.

Hierfür wurden erneut THP-1 Zellen mit den drei verschiedenen Masernviren in titrierenden *moi* infiziert und gegebenenfalls stimuliert. Die Konzentration an TNF- α im Überstand wurden nach 24 h mittels ELISA detektiert. Das Experiment erfolgte in Triplikaten. Hier zeigt sich (vergleiche Abbildung 16), dass auch nach Infektion und/oder Stimulation die THP-1-Zellen TNF- α ausschütten. Eine signifikante Reduktion der TNF- α Antwort nach Infektion und Stimulation zeigt sich gegenüber der alleinigen Stimulation mittels LPS nicht.



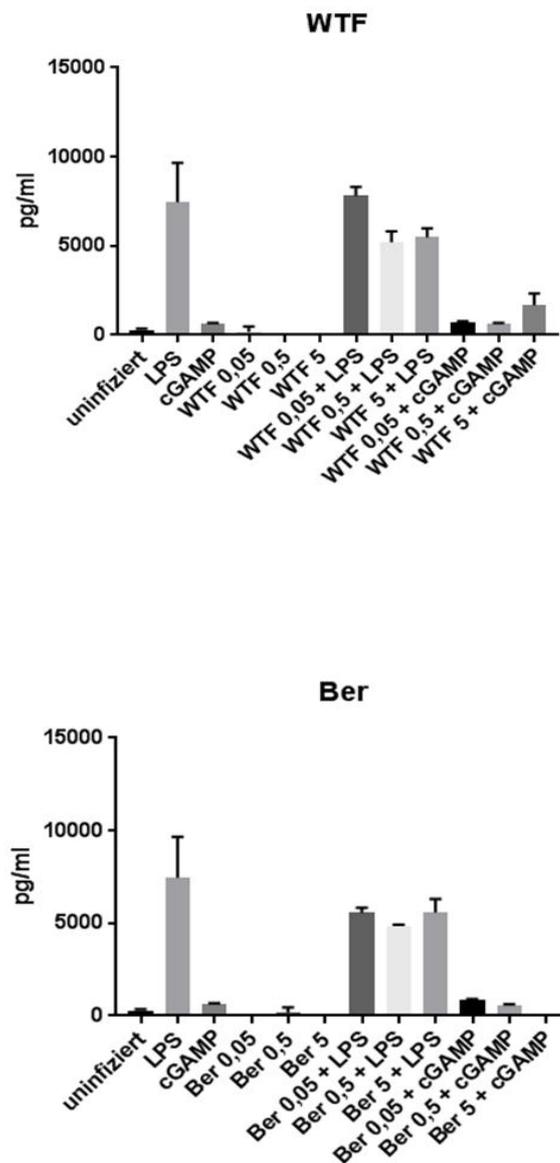


Abb. 16: TNF- α Konzentration im THP-1-Zellkulturmodell nach Infektion und Stimulation mit LPS oder cGAMP mit ansteigender moi

Darstellung des Durchschnitts der Triplikate der TNF- α Konzentrationen im Überstand der THP-1-Zellkultur. Es wurde die Infektion mit ansteigender moi (0,05, 0,5 und 5) durchgeführt und die Zellen 2 h p. I. mit den Stimulantien LPS oder 2'3'cGAMP behandelt. 24 h p. I. wurden die Überstände in Triplikaten zur Durchführung des ELISA gewonnen.

4 DISKUSSION

4.1 Deutlichere Reduktion der STING-Expression durch Wildtypstämme

Die STING-Expression von DC zeigt sich für den Impfstamm ED unter 3.2.2 zunächst nach 2 h auf das circa 1,5-fache ansteigend, dann aber zu den Zeitpunkten 6 h und 24 h p. i. kontinuierlich sinkend. Zum letzten gemessenen Zeitpunkt ist die STING-Expression gegenüber der uninfizierten Kontrolle reduziert. Zu jedem Zeitpunkt ist die Expression von STING nach Infektion mit einem Wildtyp-Masernstamm geringer ausgeprägt als im Vergleich zu einer Infektion mit dem Impfstamm. Dies bestätigen vorangehende Studien. Die Interferonantwort auf eine Infektion mit Wildtyp-Masernstämmen gegenüber der Infektion mit dem attenuierten Impfstamm ED ist um das 10- bis 80-fache reduziert^{40, 41}. Dies konnte auf zwei Mutationen im Masern V-Protein zurückgeführt werden. Es kommt zum einen zu einer Suppression der Promotoraktivität von IFN- β und zum anderen zu einer reduzierten Dimerisierung des Transkriptionsfaktors IRF-3⁴².

Jedoch zeigten auch einzelne Wildtyp-Masernstämmen eine erhöhte Induktion von IFN- β , welche dem Niveau des Edmonstonstammes entsprach. Dies konnte bei Wildtypstämmen, welche defektive interferierende RNA (di-RNA) bilden⁴¹, beobachtet werden. Hierbei handelt es sich um Virusreplikate, die durch einen Fehler in der Replikation eine Mutation aufweisen⁴³. Sie entstehen beispielsweise bei einer hohen Passagzahl oder erhöhter moi, daher sind sie vorrangig in Impfstämmen zu finden. Di-RNAs induzieren unabhängig vom Virusstamm die Induktion von Interferonen, indem sie mit der RNA-Helikase interagieren⁴⁴. Eine Studie zeigte eine ähnliche Induktion der IFN- β Antwort durch attenuierte und Wildtypstämme, wenn bei keinem der verwendeten Masernstämmen di-RNA nachweisbar war⁴⁷. Bisher liegen keine Daten vor, ob di-RNA in den hier eingesetzten Masernstämmen vorkommen, dies sollte weiter untersucht werden.

Betrachtet man nun die Translation von STING mittels Western Blot Analyse zeigt sich bei jedem eingesetzten Virus bereits nach zwei Stunden eine Reduktion der Proteinmenge, ohne dass sich dies in einer Reduktion der mRNA-Menge in der PCR widerspiegelt. Bisher sind keine Daten in der Literatur vorhanden, die den Einfluss von Masernviren sowohl auf Transkription als auch Translation des STING-Proteins

beschreiben. Allerdings ergibt eine Literaturrecherche ähnliche Ergebnisse, wenn die Translation und Transkription von IFN- β nach einer Maserninfektion betrachtet wird. Hier konnte gezeigt werden, dass die Änderung der nachgewiesenen Proteinmenge nicht mit einer Änderung auf mRNA-Ebene korreliert⁴⁵. Dies könnte auch auf eine eingeschränkte Sensitivität der gewählten Methode oder auf den autokrinen und parakrinen Verbrauch von IFN- β zurückzuführen sein. Denn IFN- β bindet an Interferonrezeptoren, um diese zu aktivieren⁴⁶.

Auch für ISG konnte eine Diskrepanz zwischen mRNA und Proteinnachweis gezeigt werden⁴⁷, jedoch sollten weitere Untersuchungen folgen, um zu untersuchen, ob hier ein vergleichbarer Mechanismus vorliegt. Auch sollte die STING-Translation und -Transkription über kürzere Zeitpunkte verglichen werden, um hier einen eventuellen Zusammenhang und früheste Veränderungen feststellen zu können.

4.2 Reduktion der STING-Antwort nach 24 h im THP-1-Zellmodell

Die THP-1-Zellen stellen ein gutes Zellmodell dar, um den Einfluss einer Masernvirusinfektion zu untersuchen. In der PCR zeigt sich vergleichbar zu den humanen dendritischen Zellen eine Reduktion der STING-mRNA nach Infektion. Dies lässt sich am deutlichsten nach Ablauf von 24 h nachweisen. Ebenfalls ist hier die Reduktion für die Wildtypstämme ausgeprägter als für den Impfstamm. Dies bestätigt, dass auch die STING-Produktion und deren Beeinflussung durch das MV im THP-1-Zellmodell mit humanen dendritischen Zellen vergleichbar ist.

Betrachtet man die Translation des Proteins STING, kann ein relevanter Anstieg der STING-Expression über das Niveau der uninfizierten Kontrolle für keinen Virusstamm und zu keinem Zeitpunkt nachgewiesen werden. Es zeigt sich sogar eine Reduktion, welche für die Wildtypstämme zum Zeitpunkt 6 h p. i. am deutlichsten ausgeprägt ist. Eine Induktion der Interferonantwort, durch eine vermehrte Transkription von STING ist somit ausgeschlossen. In der Literatur ist jedoch eine Induktion der Typ I Interferonantwort durch attenuierte Masernstämme sowohl innerhalb von zwei Stunden⁴⁴, als auch für 24 und 48 h nach Infektion zu finden⁴⁷. Die fehlende Induktion durch die Wildtypstämme ist auch auf Proteinebene sowohl 24 als auch 48 h nach Infektion beschrieben⁴⁷ und kann möglicherweise auf die Beeinflussung des IRF3- und damit des STING-Signalweges zurückgeführt werden^{44, 48}. Daten bezüglich der STING-Induktion sind jedoch in der Literatur nicht zu finden.

Daher legen die Ergebnisse dieser Arbeit nahe, dass an der Induktion der Interferonantwort durch attenuierte Virusstämme ein weiterer Signalweg beteiligt ist, beziehungsweise nicht alleinig durch eine Stimulation von STING ausgelöst wird. Jedoch kann eine Fehlbestimmung aufgrund einer zu geringen Sensitivität der Methode oder eine Verminderung des STING-Proteins aufgrund eines autokrinen und parakrinen Verbrauchs nicht sicher ausgeschlossen werden.

4.3 Nicht titrierbare Inhibition der Interferoninduktion

Des Weiteren wurde das im cGAS-STING-Signalweg nachfolgende Protein Interferon- β , mittels ELISA untersucht. Es zeigt sich keine Induktion 24 h nach Infektion, eine Stimulation mittels cGAMP wird jedoch durch die Infektion sowohl mit dem attenuierten als auch den Wildtypstämmen Ber und WTF signifikant reduziert. Dieser Effekt tritt bereits mit einer moi von 0,05 auf. Eine Titrierbarkeit dieses Effekts ist nicht gegeben. Eine Induktion der Interferonantwort ist nur für attenuierte Impfstämme, beziehungsweise für Masernstämmen, welche diRNA aufweisen, in der Literatur bekannt^{44, 47}. Eine Induktion von IFN- β wird bereits nach 2 Stunden beschrieben⁴⁴. Wie schnell dieser Wert wieder auf sein Ausgangsniveau zurückkehrt und ob das bereits nach 24 h möglich ist, ist bisher unklar. Zur weiteren Interpretation der Daten sollte überprüft werden, ob diRNA in den verwendeten Stämmen vorhanden ist und ob zu einem früheren Zeitpunkt Interferon- β nachgewiesen werden kann, beziehungsweise über welchen Zeitraum sich dieser Wert zurückbildet.

Die Induktion der Interferonantwort mittels 2'3'cGAMP ist bei mit Masernviren infizierten Zellen weniger stark ausgeprägt als in der uninfizierten Kontrolle. Dies legt nahe, dass der Ansatzpunkt der Suppression der Interferonantwort durch Masernviren im cGAS-STING-Signalweg liegt. Bereits in der Literatur beschrieben ist eine Beeinflussung von IRF3 durch das Masernvirus, allerdings im Rahmen einer Stimulation durch einen Impfstamm. Dies führt zu einer Induktion der Interferonantwort^{44, 48}.

Die Reduktion der Interferonantwort zeigt sich in der vorliegenden Arbeit bereits bei einer moi von 0,05, ist aber nicht titrierbar. Dies wäre zu erwarten, wenn eine ansteigende moi zu einem parallel ansteigenden Prozentsatz an infizierten Zellen führen würde und der Anteil an uninfizierten Zellen, welche adäquat Interferon produzieren, dementsprechend sinkt. Die vorliegenden Ergebnisse deuten darauf hin, dass ein Schwellenwert an Viruslast existiert, dessen Überschreiten zu einem vollständigen

Ausschöpfen der virusvermittelten Immunsuppression führt. Um diese Theorien weiter zu verfolgen, sollte das Spektrum der eingesetzten *moi* erweitert, sowie der Prozentsatz der infizierten Zellen ermittelt werden. Betrachtet man nun die Konzentration an TNF- α im Überstand, zeigt sich, dass die alleinige Stimulation mit LPS zu ähnlichen Werten führt wie die Stimulation und Infektion. Die Reduktion der IFN- β Antwort durch das MV ist also zum einen spezifisch für den STING Signalweg und zum anderen nicht auf einen Zelltod zurückzuführen.

4.4 Erstbeschreibung einer Reduktion der STING Expression durch LPS

Lipopolysaccharid wurde in einem Experiment als Kontrolle für die Stimulation von STING verwendet. LPS ist membranständig in gramnegativen Bakterien und bindet nach Lyse des Bakteriums an den TLR-4 humaner Zellen. Ein früher Signalweg führt zu einer Induktion von NF- κ B (nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B-cells), einem Transkriptionsfaktor für Zytokine und Adhäsionsmoleküle des Immunsystems. Eine späte Antwort führt zu einer Aktivierung von IRF3 und damit zu einer Induktion von IFN- β ⁴⁹. LPS oder der Kontakt zu anderem pathogenem Material führt damit zu einem Ausreifen der DC und zu einem Wandern von der Peripherie in lymphatische Organe. Dass sich die Expression verschiedener, an der Immunreaktion beteiligter Proteine nach Kontakt zu LPS ändert, konnte bereits durch mehrere Studien nachgewiesen werden³⁸. Eine Reduktion der STING-Expression, wie sie sich konsequent bei allen Blutspendern in dieser Arbeit zeigte, wurde bisher in der Literatur noch nicht beschrieben.

Eine schnelle Induktion der Aktivität von IRF3 direkt nach Stimulation mit LPS ist aber beschrieben. Der Höchstwert der Aktivität trat etwa zwei Stunden nach Stimulation auf, nach Ablauf von vier Stunden war die Aktivität auf das Ausgangsniveau zurückgekehrt⁵⁰. Da IRF3 durch den STING-TBK-1 Komplex phosphoryliert und damit aktiviert wird²¹, kann diskutiert werden, ob die erhöhte Aktivität von IRF3 aus einer erhöhten Aktivität von STING resultiert. Das Maximum der STING-Aktivierung wäre damit bereits zwei Stunden nach Stimulation mit LPS erreicht. Der Zeitpunkt der Messung mit 24 h nach Stimulation kann also zu spät sein, um einen Anstieg des STING-Proteins zu sehen. Eventuell wurde daher nach 24 h eine Reduktion des STING-Proteins nachgewiesen, da die erhöhte vorangegangene Aktivität zu einem vermehrten Verbrauch führte. Die Ergebnisse des Experiments unter 3.2.2 legen dies nahe. Hier zeigt sich ein Anstieg des STING-Proteins nach 2 h auf das circa 1,75-fache des

Ausgangswertes durch die Stimulation mit LPS, nach 6 h ist wieder etwa der Ausgangswert erreicht und nach 24 h ein deutlich erniedrigter Wert, wie er auch zuvor unter 3.2.1 nachgewiesen werden konnte.

Da LPS nicht als geeigneter Stimulator für eine zuverlässige positive Kontrolle geeignet ist, wurde in den weiteren Experimenten 2'3'cGAMP verwendet. 2'3'cGAMP ist ein sekundärer Botenstoff, welcher STING direkt bindet und dessen Aktivierung und Translokation bewirkt⁵¹. Diese Kaskade endet in einer Induktion der Interferon Typ I Antwort⁵², wie das Experiment unter 3.3.3 bestätigt. Es wurde wiederholt im Überstand der THP-1-Zellen nach Stimulation mit 2'3'cGAMP mittels ELISA eine signifikant erhöhte Konzentration an IFN- β nachgewiesen.

4.5 Single Nukleotide Polymorphismen von STING und deren Auswirkung

Es sind vier Single Nukleotide Polymorphismen (SNP) für den STING-kodierenden Genomabschnitt bekannt⁵³, welche in unterschiedlichen Kombinationen in der Bevölkerung verteilt sind. Der SNP R71H-G230A-R293Q (HAQ) ist bei 20,4 % der Bevölkerung weltweit nachweisbar. Er führt zu einem verminderten Ansprechen auf die Stimulierung durch zyklische Dinukleotide⁵⁴ (CDN) und damit verbunden zu einer über 90 % verminderten Fähigkeit IFN- β zu stimulieren⁵⁵. Ist die HAQ-Variante homozygot vorhanden, geht sie mit einer verminderten basalen Expression von STING einher⁵⁶. Die verschiedenen STING-Varianten der Bevölkerung könnten so die unterschiedliche STING-Grundexpression bei verschiedenen Blutspendern erklären und damit möglicherweise auch die individuellen Reaktionen der Spender auf das Masernvirus.

4.6 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte zusammenfassend gezeigt werden, dass 2 h nach Infektion von humanen DC die STING-Proteinmenge reduziert ist, ohne dass eine Reduktion der mRNA-Menge auftritt. Dies ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Eventuell ist dies auf einen erhöhten autokrinen und parakrinen Verbrauch zurückzuführen. Dieser Effekt ist in der Literatur für IFN- β zu finden.

Eine Induktion von IFN- β nach Infektionen mit MV-Viren ist bekannt. Im THP-1-Zellmodell ist jedoch sowohl für die Translation als auch für die Transkription des Proteins

STING durchgehend eine Reduktion zu finden, sodass die Induktion der IFN- β Antwort eventuell durch einen anderen Signalweg zustande kommt.

Eine Reduktion der IFN- β -Antwort nach Stimulation mittels 2'3'-cGAMP und Infektion gegenüber der alleinigen Infektion zeigt sich unabhängig von der eingesetzten moi und ist nicht titrierbar. Eine mögliche Erklärung wäre ein Schwellenwert an Viruslast, der zu einem vollständigen Ausschöpfen der virusvermittelten Immunsuppression führt. Dies sollte in weiteren Experimenten unter Verwendung noch niedrigerer moi-Werte überprüft werden.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Hintergrund:

Im März 2020 trat das Gesetz für den Schutz vor Masern und zur Stärkung der Impfprävention in Deutschland in Kraft. Ursächlich war ein Anstieg der Infektionsrate aufgrund mangelnder Impfquoten. In den Jahren 2018 und 2019 wurden in Deutschland 544 beziehungsweise 515 Maserninfektionen gemeldet. Weltweit waren es nach Statistik der WHO im Jahr 2020 etwa 7,5 Millionen Menschen mit dem Masernvirus, circa 60.700 unter ihnen mit Todesfolge. Besonders im Kindesalter handelt es sich bei der Masernvirusinfektion um eine der häufigsten Infektionskrankheiten weltweit. Auch wenn die Erkrankung nur in unter 1 % einen letalen Verlauf zeigt, kommt es in industrialisierten Ländern bei etwa 10 % der Patienten zu Komplikationen wie einer Otitis media. Die häufigste Ursache für einen letalen Ausgang der Masernerkrankung ist eine opportunistische Infektion aufgrund der durch das MV ausgelösten Immunsuppression. Die Ursache dieser Immunsuppression ist bis dato nicht vollständig verstanden. Ein möglicher Angriffspunkt für das MV ist ein Protein der angeborenen Immunantwort, STING. Es erkennt fremde intrazelluläre DNA und RNA. Über den STING-Signalweg wird der Interferon-Regulationsfaktor 3 aktiviert, welcher zu einer gesteigerten Expression der Typ-I Interferone führt. Zu ihnen zählt IFN- β , welches die virale Replikation hemmt und die Ausreifung von B-Lymphozyten zu Plasmazellen fördert.

Zielsetzung:

An anderen RNA-Viren, wie dem Influenza-A Virus, konnte gezeigt werden, dass der STING-Signalweg durch das Virus selbst direkt beeinflusst und unterbrochen wird. Die vorliegende Arbeit untersucht den Einfluss einer MV-Infektion auf die STING-Produktion und damit einen möglichen Mechanismus der Immunsuppression.

Methodik:

Es wurden humane dendritische Zellen, sowie THP-1-Zellen als Zellmodell verwendet. Diese wurden mit den Wildtypstämmen WTF und Ber, sowie dem attenuierten Impfstamm ED infiziert. Als positiv-Kontrolle diente 2'3'cGAMP. Zunächst wurde die Transkription von STING nach erfolgter MV-Infektion mittels PCR untersucht, in weiteren Experimenten auch die Translation mittels WB und die IFN- β Konzentration mit Hilfe eines ELISA.

Ergebnis:

Zunächst wurden von vier verschiedenen Blutspendern DC gewonnen und infiziert. Hier zeigt sich, dass die RNA-Expression von STING 24 h nach Infektion mit dem Impfstamm erniedrigt, mit den beiden Wildtypstämmen erhöht ist. Durchgehend lässt sich eine Reduktion von STING nach Stimulation mit LPS nachweisen. Ebenso konsistent ist ein Infektionsnachweis bei allen verwendeten MV-Stämmen möglich.

Bei einem weiteren Blutspender wurden die gewonnenen DC 2, 6 und 24 h nach Infektion mittels PCR und WB untersucht. Hier zeigt sich nach 2 h die STING-Expression zunächst bei allen verwendeten MV-Stämmen erhöht. Nach 6 h sinkt dann die Expression, bis sie nach 24 h im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle bei allen MV-Stämmen reduziert ist.

Am ehesten sind diese unterschiedlichen Ergebnisse durch eine variable Grundexpression von STING bei den Blutspendern zu erklären, sodass die THP-1-Zelllinie für die weiteren Experimente herangezogen wurde.

Auch bei den THP-1-Zellen lässt sich bereits nach Ablauf von zwei Stunden die Infektion nachweisen. Nach Ablauf von 24 h nach Infektion lässt sich sowohl mittels PCR als auch mittels WB eine Reduktion von STING gegenüber der uninfizierten Kontrolle darstellen. Bei dem Impfstamm ED ist die STING-Proteinmenge über die Zeit kontinuierlich abnehmend, bei den Wildtypstämmen ist die ausgeprägteste Reduktion nach 6 h zu messen.

Die IFN- β Konzentration wird ebenfalls für 24 h p. i. bestimmt. Für die Infektion wurden die moi 0,05, 0,5 und 5 gewählt. Nach Infektion mit dem MV steigt die IFN- β Konzentration nicht relevant an. Vergleicht man die mit 2'3'-cGAMP stimulierte Kontrolle mit THP-1-Zellen die stimuliert und infiziert sind, zeigt sich durchgehend eine signifikante Reduktion. Dieser Effekt ist jedoch nicht durch steigende moi titrierbar.

Ausblick:

In der vorliegenden Arbeit zeigt sich eine Reduktion der STING-Proteinmenge 2 h nach Infektion von humanen DC, ohne dass sich eine Reduktion der mRNA-Menge zeigt. Dies ist in der Literatur noch nicht beschrieben. Eventuell ist dies auf einen erhöhten autokrinen und parakrinen Verbrauch zurückzuführen. Dieser Effekt ist in der Literatur für IFN- β zu finden.

Eine Induktion von IFN- β nach Infektionen mit MV-Viren ist bekannt. Im THP-1-Zellmodell ist jedoch sowohl für die Translation als auch für die Transkription des Proteins STING durchgehend eine Reduktion zu finden, sodass die Induktion der IFN- β Antwort eventuell durch einen anderen Signalweg zustande kommt.

Eine Reduktion der IFN- β -Antwort nach Stimulation mittels 2'3'-cGAMP und Infektion gegenüber der alleinigen Infektion zeigt sich unabhängig von der eingesetzten moi und ist nicht titrierbar. Eine mögliche Erklärung wäre ein Schwellenwert an Viruslast, der zu einem vollständigen Ausschöpfen der virusvermittelten Immunsuppression führt. Dies könnte in weiteren Experimenten mittels noch niedrigeren moi-Werten überprüft werden.

Ebenfalls wurde bisher erstmalig nachgewiesen, dass LPS zu einer Reduktion von STING 24 h nach Stimulation von humanen DC führt. Dies ist eventuell durch einen erhöhten Verbrauch von STING bei einer sehr frühen Stimulation zu erklären. Dies sollte in weiteren Experimenten mit früheren Messpunkten weiter untersucht werden.

6 LITERATURVERZEICHNIS

1. (BZgA) BfGA: Masernschutzgesetz: rechtliche Aspekte, Accessed 08.02.2022
2. Bundestag D: Gesetz für den Schutz vor Masern und zur Stärkung der Impfprävention (Masernschutzgesetz). 2019
3. Impfpflicht soll Kinder vor Masern schützen, Available at: <https://www.bundesgesundheitsministerium.de/impfpflicht.html>.
4. D. Matysiak-Klose SW: Masern in Deutschland – Epidemiologie und Management. *DMW*, 142: 1767-1772, 2017
5. Gesundheit Bf: Nationaler Aktionsplan 2015–2020 zur Elimination der Masern und Röteln in Deutschland Available at: <https://www.bundesregierung.de/breg-de/service/publikationen/nationaler-aktionsplan-2015-2020-zur-elimination-der-masern-und-roeteln-in-deutschland-734080>. Accessed 19.12.2019
6. C. Poethko-Müller RK, S. Gillesberg Lassen, A. Siedler: Durchimpfung von Kindern und Jugendlichen in Deutschland: Aktuelle Daten aus KiGGS Welle 2 und Trends aus der KiGGS-Studie. *Bundesgesundheitsblatt*, 62: 410–421, 2019
7. Koch-Institut R: Impfkalendar (Standardimpfungen) für Säuglinge, Kinder, Jugendliche und Erwachsene. *epidemiologisches Bulletin*: 316, 2019
8. Organization WH: Global progress against measles threatened amidst COVID-19 pandemic. *The largest increase in unvaccinated children in 20 years and critical gaps in disease surveillance increase risk of measles outbreaks, putting lives at risk: WHO, CDC.* www.who.int, WHO, 2021
9. Patel MK, Gacic-Dobo M, Strebel PM, Dabbagh A, Mulders MN, Okwo-Bele JM, et al.: Progress Toward Regional Measles Elimination - Worldwide, 2000-2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*, 65: 1228-1233, 2016 10.15585/mmwr.mm6544a6
10. Groß U: *Kurzlehrbuch Medizinische Mikrobiologie und Hygiene*, Stuttgart, Georg Thieme Verlag, 2006
11. de Vries RD, McQuaid S, van Amerongen G, Yuksel S, Verburgh RJ, Osterhaus AD, et al.: Measles immune suppression: lessons from the macaque model. *PLoS pathogens*, 8: e1002885, 2012 10.1371/journal.ppat.1002885
12. Griffin DE: The Immune Response in Measles: Virus Control, Clearance and Protective Immunity. *Viruses*, 8, 2016 10.3390/v8100282
13. Komune N, Ichinohe T, Ito M, Yanagi Y: Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1 β secretion. *Journal of virology*, 85: 13019-13026, 2011 10.1128/jvi.05942-11
14. Tankeshwar A: Measles virus: structure, pathogenesis, clinical feature, complications and lab diagnosis, Available at: <https://microbeonline.com/measles-virus-structure-pathogenesis-clinical-feature-complications-and-lab-diagnosis/>. Accessed 24th May
15. Laksono BM, de Vries RD, McQuaid S, Duprex WP, de Swart RL: Measles Virus Host Invasion and Pathogenesis. *Viruses*, 8, 2016 10.3390/v8080210
16. Jurgens EM, Mathieu C, Palermo LM, Hardie D, Horvat B, Moscona A, et al.: Measles fusion machinery is dysregulated in neuropathogenic variants. *mBio*, 6, 2015 10.1128/mBio.02528-14
17. Dorig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD: The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell*, 75: 295-305, 1993 10.1016/0092-8674(93)80071-l
18. Ferren M, Horvat B, Mathieu C: Measles Encephalitis: Towards New Therapeutics. *Viruses*, 11, 2019 10.3390/v11111017
19. Hosoya M: Measles encephalitis: direct viral invasion or autoimmune-mediated inflammation? *Internal medicine (Tokyo, Japan)*, 45: 841-842, 2006 10.2169/internalmedicine.45.0161
20. Fisher DL, Defres S, Solomon T: Measles-induced encephalitis. *QJM : monthly journal of the Association of Physicians*, 108: 177-182, 2015 10.1093/qjmed/hcu113
21. Ma Z, Damania B: The cGAS-STING Defense Pathway and Its Counteraction by Viruses. *Cell host & microbe*, 19: 150-158, 2016 10.1016/j.chom.2016.01.010

22. Riera Romo M, Perez-Martinez D, Castillo Ferrer C: Innate immunity in vertebrates: an overview. *Immunology*, 148: 125-139, 2016 10.1111/imm.12597
23. Corvillo F, Akinci B: An overview of lipodystrophy and the role of the complement system. *Molecular immunology*, 112: 223-232, 2019 10.1016/j.molimm.2019.05.011
24. Dunkelberger JR, Song WC: Complement and its role in innate and adaptive immune responses. *Cell research*, 20: 34-50, 2010 10.1038/cr.2009.139
25. Collin M, Bigley V: Human dendritic cell subsets: an update. *Immunology*, 154: 3-20, 2018 10.1111/imm.12888
26. de Witte L, Abt M, Schneider-Schaulies S, van Kooyk Y, Geijtenbeek TB: Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *Journal of virology*, 80: 3477-3486, 2006 10.1128/JVI.80.7.3477-3486.2006
27. Sallusto F, Lanzavecchia A: Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *The Journal of experimental medicine*, 179: 1109-1118, 1994 10.1084/jem.179.4.1109
28. Chanput W, Mes JJ, Wichers HJ: THP-1 cell line: an in vitro cell model for immune modulation approach. *International immunopharmacology*, 23: 37-45, 2014 10.1016/j.intimp.2014.08.002
29. Gao XX, Wang BX, Fei XF, Zhang J, Gong YJ, Minami M, et al.: Effects of polysaccharides (F10-c) from mycelium of *Ganoderma tsugae* on proinflammatory cytokine production by THP-1 cells and human PBMC (II). *Acta pharmacologica Sinica*, 21: 1186-1192, 2000
30. Leopardi R, Vainionpää R, Hurme M, Siljander P, Salmi AA: Measles virus infection enhances IL-1 beta but reduces tumor necrosis factor-alpha expression in human monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 149: 2397-2401, 1992
31. Sharif O, Bolshakov VN, Raines S, Newham P, Perkins ND: Transcriptional profiling of the LPS induced NF-kappaB response in macrophages. *BMC immunology*, 8: 1, 2007 10.1186/1471-2172-8-1
32. McNab F, Mayer-Barber K, Sher A, Wack A, O'Garra A: Type I interferons in infectious disease. *Nature reviews Immunology*, 15: 87-103, 2015 10.1038/nri3787
33. Kaplan A, Lee MW, Wolf AJ, Limon JJ, Becker CA, Ding M, et al.: Direct Antimicrobial Activity of IFN-beta. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 198: 4036-4045, 2017 10.4049/jimmunol.1601226
34. Versteeg GA, Garcia-Sastre A: Viral tricks to grid-lock the type I interferon system. *Current opinion in microbiology*, 13: 508-516, 2010 10.1016/j.mib.2010.05.009
35. Shivakoti R, Hauer D, Adams RJ, Lin WH, Duprex WP, de Swart RL, et al.: Limited in vivo production of type I or type III interferon after infection of macaques with vaccine or wild-type strains of measles virus. *J Interferon Cytokine Res*, 35: 292-301, 2015 10.1089/jir.2014.0122
36. Holm CK, Rahbek SH, Gad HH, Bak RO, Jakobsen MR, Jiang Z, et al.: Influenza A virus targets a cGAS-independent STING pathway that controls enveloped RNA viruses. *Nature communications*, 7: 10680, 2016 10.1038/ncomms10680
37. McAleer WJ, Miller WJ, Hurni WM, Machlowitz RA, Hilleman MR: Automated cytopathic effect (CPE) assays. *J Biol Stand*, 11: 241-246, 1983
38. Hancock DG, Shklovskaya E, Guy TV, Falsafi R, Fjell CD, Ritchie W, et al.: A systems biology approach to the analysis of subset-specific responses to lipopolysaccharide in dendritic cells. *PLoS One*, 9: e100613, 2014 10.1371/journal.pone.0100613
39. Brown J, Wang H, Hajishengallis GN, Martin M: TLR-signaling networks: an integration of adaptor molecules, kinases, and cross-talk. *Journal of dental research*, 90: 417-427, 2011 10.1177/0022034510381264
40. Nanche D, Yeh A, Eto D, Manchester M, Friedman RM, Oldstone MB: Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of Alpha/Beta interferon production. *Journal of virology*, 74: 7478-7484, 2000 10.1128/jvi.74.16.7478-7484.2000

41. Kessler JR, Kremer JR, Muller CP: Interplay of measles virus with early induced cytokines reveals different wild type phenotypes. *Virus research*, 155: 195-202, 2011
10.1016/j.virusres.2010.10.005
42. Takaki H, Watanabe Y, Shingai M, Oshiumi H, Matsumoto M, Seya T: Strain-to-strain difference of V protein of measles virus affects MDA5-mediated IFN- β -inducing potential. *Molecular immunology*, 48: 497-504, 2011 10.1016/j.molimm.2010.10.006
43. Perrault J: Origin and replication of defective interfering particles. *Current topics in microbiology and immunology*, 93: 151-207, 1981 10.1007/978-3-642-68123-3_7
44. Shingai M, Ebihara T, Begum NA, Kato A, Honma T, Matsumoto K, et al.: Differential type I IFN-inducing abilities of wild-type versus vaccine strains of measles virus. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 179: 6123-6133, 2007 10.4049/jimmunol.179.9.6123
45. Duhon T, Herschke F, Azocar O, Druelle J, Plumet S, Delprat C, et al.: Cellular receptors, differentiation and endocytosis requirements are key factors for type I IFN response by human epithelial, conventional and plasmacytoid dendritic infected cells by measles virus. *Virus research*, 152: 115-125, 2010 10.1016/j.virusres.2010.06.013
46. Honda K, Taniguchi T: IRFs: master regulators of signalling by Toll-like receptors and cytosolic pattern-recognition receptors. *Nature reviews Immunology*, 6: 644-658, 2006
10.1038/nri1900
47. Shivakoti R, Siwek M, Hauer D, Schultz KL, Griffin DE: Induction of dendritic cell production of type I and type III interferons by wild-type and vaccine strains of measles virus: role of defective interfering RNAs. *Journal of virology*, 87: 7816-7827, 2013 10.1128/jvi.00261-13
48. Schlender J, Hornung V, Finke S, Günthner-Biller M, Marozin S, Brzózka K, et al.: Inhibition of toll-like receptor 7- and 9-mediated alpha/beta interferon production in human plasmacytoid dendritic cells by respiratory syncytial virus and measles virus. *Journal of virology*, 79: 5507-5515, 2005 10.1128/jvi.79.9.5507-5515.2005
49. Palsson-McDermott EM, O'Neill LA: Signal transduction by the lipopolysaccharide receptor, Toll-like receptor-4. *Immunology*, 113: 153-162, 2004 10.1111/j.1365-2567.2004.01976.x
50. Seok J, Xiao W, Moldawer LL, Davis RW, Covert MW: A dynamic network of transcription in LPS-treated human subjects. *BMC systems biology*, 3: 78, 2009 10.1186/1752-0509-3-78
51. Ablasser A, Goldeck M, Cavlar T, Deimling T, Witte G, Röhl I, et al.: cGAS produces a 2'-5'-linked cyclic dinucleotide second messenger that activates STING. *Nature*, 498: 380-384, 2013
10.1038/nature12306
52. Ishikawa H, Ma Z, Barber GN: STING regulates intracellular DNA-mediated, type I interferon-dependent innate immunity. *Nature*, 461: 788-792, 2009 10.1038/nature08476
53. Yi G, Brendel VP, Shu C, Li P, Palanathan S, Cheng Kao C: Single nucleotide polymorphisms of human STING can affect innate immune response to cyclic dinucleotides. *PLoS One*, 8: e77846, 2013 10.1371/journal.pone.0077846
54. Ruiz-Moreno JS, Hamann L, Shah JA, Verbon A, Mockenhaupt FP, Puzianowska-Kuznicka M, et al.: The common HAQ STING variant impairs cGAS-dependent antibacterial responses and is associated with susceptibility to Legionnaires' disease in humans. *PLoS pathogens*, 14: e1006829, 2018 10.1371/journal.ppat.1006829
55. Jin L, Xu LG, Yang IV, Davidson EJ, Schwartz DA, Wurfel MM, et al.: Identification and characterization of a loss-of-function human MPYS variant. *Genes Immun*, 12: 263-269, 2011
10.1038/gene.2010.75
56. Patel S, Blaauboer SM, Tucker HR, Mansouri S, Ruiz-Moreno JS, Hamann L, et al.: The Common R71H-G230A-R293Q Human TMEM173 Is a Null Allele. *Journal of immunology (Baltimore, Md : 1950)*, 198: 776-787, 2017 10.4049/jimmunol.1601585

7 ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1: Schematische Darstellung der Genomorganisation des Masernvirus

Abbildung 2: Schematische Darstellung der Invasion und Transmission des Masernvirus

Abbildung 3: Schematische Darstellung des cGAS-STING Signalweges

Abbildung 4: FACS-Analyse der unreifen DC an Tag 0 und Tag 6 mit Immunfluoreszenzfärbung der Oberflächenmarker CD14 und CD1a

Abbildung 5: Banddichte des Masern-F-Proteins sowie des Zellkerns in humanen DC 24h nach Infektion mit ED oder einer Mock-Präparation

Abbildung 6: Durchlichtmikroskopbilder von DC und THP-Zellen 24 h nach Infektion mit ED (A) und Ber (B) mit einer moi von 0,5, sowie von uninfizierten THP-Zellen (C)

Abbildung 7: RT-PCR Produkte der Gene β -Aktin, MV-L und STING von vier Blutspendern

Abbildung 8: Banddichten der mittels RT-PCR ermittelten STING Expression zu β -Aktin normalisiert und über die vier Spender gemittelt

Abbildung 9: RT-PCR Produkte von β -Aktin, des Masern-L Proteins sowie STING bei 2,6 und 24h p.i. für die Ansätze uninfiziert, LPS stimuliert und infiziert mit ED, Ber oder WTF

Abbildung 10: Gegenüber β -Aktin normalisierte STING Banddichten der RT-PCR nach Entnahmezeitpunkt für die Ansätze uninfiziert, LPS, ED, Ber und WTF.

Abbildung 11: Banddichten der Darstellung des STING Proteins mittels Western Blot für die Ansätze ED, WTF und Ber jeweils 2,6 und 24h p.i. im Vergleich zur uninfizierten Kontrolle

Abbildung 12: RT-PCR Amplifikate für THP-1 Zellen 2,6 und 24h p.i

Abbildung 13: Dargestellt sind die Banddichten der STING Banden einer RT-PCR der Ansätze uninfiziert, cGAMP und mit ED, WTF oder Ber infiziert für die Zeitpunkte 2,6 und 24h p.i. normalisiert gegenüber β -Aktin.

Abbildung 14: Banddichten des Western Blots für das Proteins STING nach Infektion mit ED, WTF und Ber in Referenz zu der uninfizierten Kontrolle.

Abbildung 15: IFN- β Konzentration im THP-1 Zellkulturmodell nach Infektion mit ansteigender moi

Abbildung 16: TNF- α -Konzentration im THP-1 Zellkulturmodell nach Infektion und Stimulation mit LPS oder cGAMP mit ansteigender moi

8 LEBENS LAUF

PERSONALIEN

Name und Vorname: Dremel, Judith Ingrid.....
Geburtsdatum: 20.03.1995.....
Geburtsort: Nürnberg.....

SCHULISCHER WERDEGANG

Sep 2001 – Juli 2005 Erich-Kästner-Grundschule Nürnberg
Sep 2005 – Juli 2013 Sigmund-Schuckert-Gymnasium Nürnberg

UNIVERSITÄRER WERDEGANG

WS2013/2014 Beginn des Studiums Humanmedizin an der Medizinischen Fakultät Mannheim der Universität Heidelberg
07.09.2015 1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M1)
11.10.2018 2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M2)
14.11.2019 3. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung (M3)

BERUFLICHER WERDEGANG

Seit 15.02.2020 Ärztin in Weiterbildung am Universitätsklinikum Mannheim, Klinik für Neurochirurgie

9 DANKSAGUNG

An erster Stelle möchte ich mich bei meinem Doktorvater Prof. Dr. med. Thomas Miethke für die Möglichkeit bedanken, meine Dissertation an seinem Lehrstuhl zu verfassen. Ebenso für die engmaschige Betreuung, Unterstützung und Diskussionsbereitschaft. Insbesondere letztere hat mir oft geholfen, Ergebnisse aus anderen Blickwinkeln zu betrachten und so die richtigen Schlüsse zu ziehen.

Des Weiteren möchte ich mich bei der Betreuerin meiner Forschungsarbeit bedanken, Frau Dr. rer. nat. Marion Kopcak. Sie hat mich in das wissenschaftliche Arbeiten, sowie die Grundlagen der Labortechniken eingewiesen. Besonders auch für ihre Bereitschaft noch nach dem Wechsel ihrer Arbeitsstelle das Fortschreiten der Experimente und dieser Arbeit mit Interesse und Anteilnahme zu verfolgen.

Ohne die Hilfe des gesamten mikrobiologischen Teams und der guten Stimmung im Labor wäre meine wissenschaftliche Arbeit deutlich anstrengender gewesen. Besonders danken möchte ich auch den beiden medizinisch-technischen Assistentinnen Maren Keller und Hannah Griffiths für die tatkräftige Unterstützung und große Hilfsbereitschaft beim Lösen der kleinen und großen Probleme im Laboralltag. Auch bei beiden Biologinnen im Labor, Frau Dr. rer. nat. Silke Neumann-Pfeifer und Frau Dr. rer. nat. Simone Albrecht, möchte ich mich bedanken, da sie mir zu jeder Tageszeit mit schneller Hilfe und Ratschlägen die Arbeit erheblich erleichtert haben.

Anschließend möchte ich mich für die Unterstützung meiner gesamten Familie bedanken. Meine Eltern haben mein Studium, sowie meine Doktorarbeit fortwährend gefördert und mit großer Anteilnahme und Interesse verfolgt.

Vielen Dank!