Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg Medizinische Fakultät Mannheim Dissertations-Kurzfassung

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

Autor: Judith Ingrid Dremel
Institut / Klinik: Institut für Medizinische Mikrobiologie und Hygiene
Doktorvater: Prof. Dr. T. Miethke

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. Zusammenfassung 52 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.