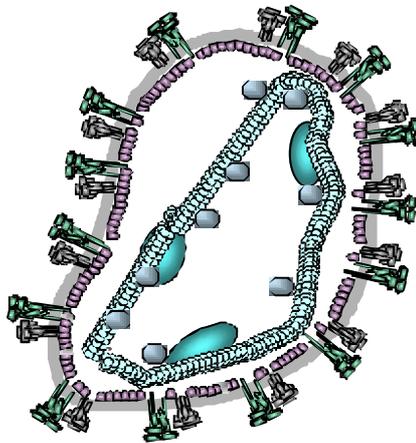


Untersuchung der Infizierbarkeit von Endothelzellen mit Masernviren und des Interferon-induzierten antiviral wirksamen Mechanismus



**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg**

vorgelegt von

Mag. rer. nat. Karola Obojes

aus St. Vigil-Enneberg, Italien

Würzburg, 2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Prof. Dr. Ulrich Scheer

Gutachter: Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben gesucht.

Kürnach, den 05. August 2005

Mag. rer. nat. Karola Obojes

Meinen Eltern in Dankbarkeit

Für Manuela

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Die Krankheit Masern.....	1
1.1.1 Epidemiologie.....	1
1.1.2 Pathogenese	3
1.1.3 Neurovirulenz bei Masern	5
1.2 Die Biologie des Masernvirus (MV)	7
1.2.1 Taxonomie	7
1.2.2 Morphologie.....	8
1.2.3 Die Proteine des MV.....	9
1.2.4 Genomaufbau und Replikation	12
1.3 Zelluläre Rezeptoren für MV.....	14
1.3.1 Vorkommen, Struktur und Funktion von CD46	14
1.3.2 Vorkommen, Struktur und Funktion von SLAM.....	18
1.4 Endothelzelltropismus der MV	21
1.5 Interferone.....	22
1.5.1 Einteilung der Interferone.....	23
1.5.1.1 Typ I-Interferone.....	24
1.5.1.2 Typ II-Interferone	26
1.5.2 Antivirale Aktivität von Interferonen	27
1.6 Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)	30
1.6.1 IDO-Aktivität.....	33
1.7 Ziele der Arbeit	34
2 Material	35
2.1 Zellen	35
2.2 Viren	36
2.3 Antikörper.....	37
2.3.1 Primärantikörper	37
2.3.2 Sekundärantikörper.....	37
2.4 Medien, Lösungen und Puffer	38
2.4.1 Zellkultur	38
2.4.1.1 Spezielles Medium (HBMECs)	39
2.4.1.2 Spezielles Medium (HUVECs).....	39
2.4.2 Bakterienkultur	39
2.4.3 Molekularbiologie.....	40
2.4.4 Proteinbiochemie	40
2.5 Oligonukleotide (Primer).....	42
2.6 Zytokine	42
2.7 Kits.....	43
2.8 Enzyme	43
2.9 Chemikalien	43
2.10 Verbrauchsmaterialien	45

2.11 Geräte.....	46
------------------	----

3 Methoden..... 48

3.1 Zellbiologische Methoden	48
3.1.1 Passagieren von Zellen	48
3.1.2 Zellkultur adhärenter Zellen	48
3.1.3 Zellkultur von Suspensionszellen	49
3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	49
3.1.5 Mykoplasmentest	50
3.1.6 Beschichten der Kulturflaschen mit Gelatine	51
3.1.7 Bestimmen der Gesamtzellzahl und deren Lebensfähigkeit.....	51
3.1.8 Isolierung von HUVECs	52
3.2 Virologische Methoden.....	53
3.2.1 Virusvermehrung (attenuierte Masernvirusstämme)	53
3.2.2 Virusvermehrung (Wildtyp-Masernvirusstämme).....	54
3.2.3 Ultrazentrifugation von MV-Präparationen.....	55
3.2.4 Plaque-Test	55
3.2.5 Virus-Klonierung	56
3.2.6 Virustiter-Bestimmung durch Endpunkt-Titration	56
3.2.7 TCID ₅₀ Test (50 % - Endpunkt-Titration)	57
3.3 Histochemische Methoden.....	58
3.3.1 Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie (FACS)	58
3.3.2 Immunfluoreszenzfärbung im Lab-Tek [®] II Chamber Slide	59
3.3.3 Herstellung von MOWIOL [®] 4-88	60
3.4 Proteinspezifische Methoden	61
3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen.....	61
3.4.2 Herstellung von Zellysaten	61
3.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	62
3.4.4 Western-Blot.....	63
3.4.5 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen.....	64
3.4.6 Reinigung von monoklonalen Antikörpern	65
3.4.7 Messung der IDO-Aktivität	65
3.5 Molekularbiologische Methoden	67
3.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien	67
3.5.2 Transformation kompetenter Bakterien.....	67
3.5.3 Isolation extrachromosomaler DNA aus Bakterien	68
3.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren.....	69
3.5.5 Plasmid Restriktion.....	69
3.5.6 Plasmid Dephosphorylierung.....	70
3.5.7 Plasmid Ligation	70
3.5.8 DNA und RNA Gelelektrophorese	71
3.5.9 Reverse Transkription.....	72
3.5.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR).....	73
3.5.11 DNA-Sequenzierung.....	75
3.5.12 <i>In vitro</i> -Mutagenese	76

4 Ergebnisse	77
4.1 Nachweis von Mykoplasmen.....	77
4.2 Nachweis von bekannten Masernrezeptoren	78
4.2.1 Nachweis von hCD46- und hCD150-Transkripten in EZ	78
4.2.2 Nachweis von hCD46- und hCD150-Protein in EZ	79
4.2.3 Induzierbarkeit von SLAM.....	81
4.3 Infektion primärer EZ mit MV	82
4.3.1 MV-H Expression auf EZ.....	82
4.3.2 CD46-Expression auf EZ.....	83
4.4 IFN-Effekte bei MV.....	85
4.4.1 Wirkung von IFN auf MV-Impfstämme in EZ.....	85
4.4.2 Wirkung von IFN auf MV-Wildtypstämme in EZ	86
4.4.3 Wirkung von IFN bei infizierten B-Lymphozyten	88
4.4.4 Wirkung von IFN auf die MV-Titer	89
4.4.5 Antivirale Wirkung von IFN.....	91
4.4.6 Vorbehandlung mit IFN.....	93
4.4.7 Wirkung von IFN- γ auf das Zellwachstum.....	94
4.5 Induktion der IDO.....	95
4.5.1 Erstellen einer Kynurenin-Standardkurve	95
4.5.2 Superinduktion mit IL-1 β	96
4.5.3 Nachweis und Steigerung der IDO-Aktivität.....	98
4.6 IDO im Zuge einer MV-Infektion	101
4.6.1 Nachweis der IDO mRNA	101
4.6.2 Nachweis der IDO-Aktivität.....	103
4.6.3 Nachweis des IDO-Proteins.....	104
4.7 STAT1 Aktivierung während einer MV-Infektion.....	107
4.8 IDO im Zuge einer HSV-1 Infektion.....	109
4.9 Wirkung von Tryptophan.....	110
5 Diskussion	113
5.1 Charakterisierung der MV-Rezeptoren in EZ.....	113
5.2 Infizierbarkeit der EZ durch MV	114
5.3 Wirkung von IFN auf die MV-Replikation in EZ	117
5.4 Korrelation des antiviralen Effektes mit der Induktion der IDO-Aktivität	120
5.5 IDO Induktion durch Viren?.....	122
5.6 IDO als antivirales Enzym mittels Tryptophan?.....	122
5.7 Erklärungsversuche für die antivirale Wirkung der IDO.....	124
5.8 Biologische Bedeutung der IDO-Induktion.....	125
6 Zusammenfassung.....	129
7 Summary	131

8 Literaturverzeichnis.....	133
9 Abkürzungen	166
10 Lebenslauf.....	171
11 Veröffentlichungen.....	173
11.1 Publikationen und Preise	173
11.2 Vorträge	174
11.3 Posterpräsentationen	175
12 Danksagung.....	178

1 Einleitung

1.1 Die Krankheit Masern

1.1.1 Epidemiologie

Masern (lat. *Morbilli*) ist eine durch das Masernvirus (MV) verursachte, weltweit verbreitete, akute Infektionskrankheit (ter Meulen & Billeter, 1995; Duke & Mgone, 2003). Allein im Jahre 2002 erkrankten 30 Millionen Menschen und starben weltweit 614.000 Kinder an Masern (WHO/UNICEF, 2002). Aufgrund der hohen Ansteckungsfähigkeit treten Masern meist als Kinderkrankheit auf und hinterlassen eine lebenslange Immunität (Katz, 1995). Es sind vor allem Menschen, überwiegend im Kleinkindalter in den Entwicklungsländern betroffen, wo mangelnde Ernährung, fehlende Hygiene und schlechte medizinische Versorgung 300 mal mehr Todesfälle fordern als in den Industrienationen (WHO/UNICEF, 2002).

Vor der Einführung eines Masernimpfstoffes waren 95 % bis 98 % der Kinder bis 18 Jahren mit dem MV infiziert (Langmuir, 1962; Langmuir *et al.*, 1962; Snyder *et al.*, 1962). Seit den 70er Jahren steht zur Bekämpfung der Maserninfektion ein Impfstoff zur Verfügung. Dieser Schutz aus attenuierten Lebendviren gehört zu den allgemein empfohlenen Impfmaßnahmen und ist Bestandteil des erweiterten Impfprogrammes (EPI) der Weltgesundheitsorganisation. Die WHO und UNICEF haben einen offiziellen Impfplan erlassen, um die mit Masern verbundene globale Morbidität und Mortalität drastisch zu reduzieren (WHO, 2001). Das Eradikationsprogramm sieht als Gesundheitsziel vor, die Masernmortalität in Europa bis zum Jahr 2005 zu halbieren und bis 2007 (2010) soll Masern gänzlich eliminiert werden (Epidemiologisches Bulletin; Nr. 1, 2003). Das ist möglich, da der Mensch das einzige Virus-Reservoir ist.

In den USA konnte gezeigt werden, dass die Infektionsrate von 44 % bei nicht immunisierten Kindern auf 3 % bei immunisierten Kindern reduziert werden konnte (Vitek *et al.*, 1999). Trotz weltweiter Impfkampagnen treten vereinzelt immer noch Epidemien in den Industrieländern auf. Zwischen 1989 und 1991 kam es in den USA zu einzelnen Masernausbrüchen mit über 55.000 Fällen (Atkinson *et al.*, 1992). Das National Center for Health Statistics (NCHS) zusammen mit dem National Immunization Program (NIP) und dem Centers for Disease Control and Prevention (CDC) haben inzwischen veröffentlicht, dass zwischen 1993 und 1999 die Zahl der Masern-erkrankungen unter 1000 Fälle pro Jahr gesunken ist (Gindler *et al.*, 2004).

In Europa kommen Masern noch endemisch vor und führen gelegentlich zu Ausbrüchen, wobei zunehmend mehr Jugendliche und Erwachsene betroffen sind, da die Impfakzeptanz in den letzten Jahren deutlich abgenommen hat.

In der ersten Hälfte des Jahres 2000 wurden im Ostteil der Republik Irland 496 Masern-Erkrankungen registriert. 350 der Erkrankungen traten im Norden der Stadt Dublin und Umgebung auf. 60 der Erkrankten (12 %) mussten in Krankenhäusern behandelt werden (Epidemiologisches Bulletin; Nr. 7, 2000; Epidemiologisches Bulletin; Nr. 19, 2000). Die Gesundheitsbehörden versuchten die näheren Umstände des Auftretens der Masernfälle zu ermitteln und die Untersuchungen ergaben, dass ein beträchtlicher Teil der erkrankten Kinder nicht das Alter für die Masern-Impfung (in Irland 15 Monate) erreicht hatte. Im Rahmen der Bekämpfung weiterer Ausbrüche wurde daher entschieden das Alter der Masern-Impfung auf oder um 6 Monate zu verlegen.

Im November 2001 begann in Deutschland im Stadt- und Landkreis Coburg in Nordbayern eine größere Masernepidemie. Insgesamt wurden im Zeitraum von November 2001 bis April 2002 1166 Masernerkrankungen gemeldet. Ausgangspunkt war eine anthroposophische Schule, von der sich die Masern in weiteren Schulen und Kindertagesstätten ausbreiteten. Die Ursache lag in der niedrigen Durchimpfungs-rate von etwa 77 % in Coburg, im Gegensatz zu den umliegenden Kreisen mit einer Durchimpfungsrate von über 90 % (Epidemiologisches Bulletin; Nr. 42, 2003). Die meisten Erkrankten waren Kinder im Alter von 5-9 Jahren (377 = 41 % aller Fälle; 50 Erkrankungen pro 1.000 Kinder der Gruppe), es folgten die Gruppen 1-4 Jahre (285 = 31 %; 54 Erkrankungen pro 1.000) und 10-14 Jahre (161 = 18 %; 20 Erkrankungen pro 1.000) (Epidemiologisches Bulletin; Nr. 12, 2002; Ludwig *et al.*, 2004).

Da Masern eine hoch infektiöse Viruserkrankung ist und aerogen übertragen wird, ist in Deutschland ein bundesweites laborgestütztes Sentinel der Arbeitsgemeinschaft Masern (AGM) eingeführt worden. Ferner besteht seit 2001 bei Masern eine allgemeine Meldepflicht nach dem Infektionsschutzgesetz (IfSG, 2001) (Epidemiologisches Bulletin; Nr. 42, 2003). Außerdem wird in Deutschland auf der Grundlage der Empfehlung der Ständigen Impfkommission (STIKO) am Robert Koch Institut in Berlin die Masern-Erstimpfung ab dem 12. Lebensmonat empfohlen (Epidemiologisches Bulletin; Nr. 19, 2000).

Im Jahre 2002 trat ein Masernausbruch in Italien auf, der hauptsächlich die Regionen mit besonders niedrigen Impfraten betraf. Am stärksten von der Epidemie betroffen war die Region Kampanien in Süditalien. Die Zahl der Erkrankten lag bis Mitte des Jahres bei etwa 14000. Es wurden 4 Todesfälle und 16 schwerste Komplikationen wie Enzephalitis gemeldet. Auch in einer weiteren süditalienischen Provinz, Campobasso in der Region Molise, ließ sich ein Zusammenhang zwischen Impfrate und Inzidenz erkennen. Bei einer durchschnittlichen Impfrate von nur 65 % erkrankten 269 Kinder unter 15 Jahren an Masern (1.400 Erkrankungen pro 100.000 Einwohner der Altersgruppe). Es zeigte sich eine deutliche Korrelation zwischen der Abnahme der Impfrate mit zunehmendem Lebensalter der Kinder und der gleichzeitig ansteigenden Inzidenz der Masern (Epidemiologisches Bulletin; Nr. 1, 2003; Centers for Disease Control and Prevention, 2003). Als Reaktion auf diese Masernepidemie wurden vom italienischen Gesundheitsministerium, dem nationalen Gesundheitsinstitut und regionalen Gesundheitsbehörden ein Aktionsplan zur Elimination der Masern durch Verbesserung der Impfraten entwickelt (Epidemiologisches Bulletin; Nr. 28, 2003).

1.1.2 Pathogenese

Die Kinderkrankheit Masern wird durch den Erreger Masernvirus hervorgerufen. Masern ist hochansteckend und der Kontagionsindex liegt über 90 %; dies bedeutet, mehr als 90 % der nicht immunen Personen, welche mit Masern-Infizierten in Kontakt kommen, erkranken. Die Übertragung erfolgt aerosolisch durch Tröpfcheninfektion, wobei die Infektion auch über größere Entfernungen möglich ist. Charakteristisch für

den Infektionsverlauf ist eine Inkubationszeit von 9 bis 12 Tagen, wobei 12 bis 15 Tage nach der Infektion ein typisches Exanthem entsteht.

Bei Masern ist der zweigipflige Verlauf während der drei klinischen Stadien hervorzuheben.

Im Prodromalstadium weist der Erkrankte Symptome wie Fieber, Husten, Schnupfen, Bindehautentzündung und Koplik-Flecken (Reubold-Flecken; Reubold-Kopliksche-Flecken) der Mundschleimhaut auf. Dieser typische Masernausschlag der Wangenschleimhaut ist weiß, leicht erhaben, ca. 0,5 mm groß und gegenüber den Backenzähnen zu finden. Diese Flecken treten drei Tage vor dem Hautexanthem auf und erlauben somit eine frühzeitige Diagnose.

Das Exanthemstadium dauert etwa drei Tage und ist mit einem erneuten Fieberanstieg auf 39 bis 40 °C verbunden. Das für Masern typische rötliche Exanthem beginnt hinter den Ohren und verbreitet sich über Hals, Gesicht, Schultern und Rumpf bis zu den Extremitäten hin aus.

Im Rekonvaleszenzstadium ist das Exanthem bereits abgeklungen, aber es bleibt eine Anfälligkeit gegenüber anderen Erkrankungen.

Wichtig zu erwähnen ist, dass die Infektiosität bei Masern ab dem Prodromalstadium bis 1 bis 2 Tagen nach dem Exanthemstadium anhält.

Die MV gelangen über den oberen Respirationstrakt in den Körper und führen anschließend zu einer systemischen Infektion. Zuerst werden vermutlich die Epithelzellen der Atemwege infiziert. Das MV wird dann vorwiegend von Dendritischen Zellen (DZ) in die lymphatischen Gewebe transportiert, zeigt aber auch einen deutlichen Tropismus für Lympho- und Monozyten.

Nach einer lytischen Virusvermehrung in den lokalen Lymphknoten kommt es zu einer virämischen Phase und einer Verbreitung des Virus im Körper. Über infizierte Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen werden Epithelzellen und Endothelzellen in verschiedenen Organen wie Leber, Niere, Gastrointestinaltrakt, Lunge und Haut infiziert. In den infizierten Makrophagen wird das Adhäsionsmolekül LFA-1 verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert, was den Zelleintritt ins Gewebe erleichtern und die Verbreitung des Virus fördern könnte (Attibele *et al.*, 1993). Während der Virämie entsteht das Exanthem (Kempe & Fulginiti, 1965; Moench *et al.*, 1988; Esolen *et al.*, 1993). Verursacht wird es durch direkte virusbedingte oder toxisch-allergische

Permeabilitätssteigerung von Gefäß- und Zellwänden. Dies führt zu einem hämorrhagischen Einschlag des Exanthems und kann außerdem Endothelschäden im Bereich der Lungenkapillaren verursachen. Zu diesem Zeitpunkt befindet sich das Virus auch in den peripheren Leukozyten des Blutes.

Die Maservirusinfektion ist mit einer durch das Virus induzierten Immunsuppression verbunden, die über mehrere Wochen nach Ausbruch des Exanthems anhalten kann. Aus infizierten Epithelzellen in Mund und Rachenbereich ist eine Isolation von MV aus Rachenabstrichen möglich; auch in den Konjunktiva des Auges befinden sich MV vorwiegend in den Epithelzellen, die durch Abstriche isoliert werden können. MV werden zellgebunden mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden. Dies erlaubt eine Virusisolation aus Makrophagen, die sich im Urin befinden. Zudem können MV aus infizierten peripheren mononukleären Zellen des Blutes isoliert werden (Lightwood & Nolan, 1970).

1.1.3 Neurovirulenz bei Masern

Bei Masern können sich auch neurologische Komplikationen im Zentralnervensystem (ZNS) entwickeln (Katz, 1995; Norrby & Kristensson, 1997).

Die akute postinfektiöse Masernenzephalitis (APME) tritt bei ca. 0,5-1/1000 Fällen auf, beginnt im Durchschnitt 8 Tage nach Beginn des Exanthems und weist eine Letalität von 10 bis 20 % auf. Histopathologisch kann man Demyelinisierungen, Gliosen, fetthaltige Makrophagen und perivaskuläre Infiltrate an den Gefäßwänden nachweisen (Katz, 1995; Duclos & Ward, 1998).

Die Maserneinschlusskörperchen Enzephalitis (MIBE, *Measles Inclusion Body Encephalitis*) ist eine unheilbare, späte neurologische Komplikation mit stets tödlichen Verlauf. Sie kommt nur bei immunsupprimierten Patienten ca. 3 bis 6 Monate nach akuten Masern vor und ist erst in neuerer Zeit als Erkrankungsbild in zumeist iatrogen immuninkompetenten Kindern und jungen Erwachsenen beschrieben worden (Roos *et al.*, 1981). Charakteristische klinische Anzeichen sind Konvulsion, lokale Myoklonien, gefolgt von Lähmungen, Koma und Stupor. Hervorzuheben ist, dass vor allem im Kern und im Zytoplasma von Neuronen und Gliazellen Einschlusskörperchen nachzuweisen sind. Exakte MIBE-Diagnosen lassen sich einerseits nur durch histologische

Untersuchungen von Biopsie-Material und sich andererseits mit Analysen von viralen Antigenen in den Zellen und von Virus spezifischer RNA durch PCR erstellen (Cattaneo *et al.*, 1988; Bitnun *et al.*, 1999; Schneider-Schaulies & ter Meulen, 1999; Freeman *et al.*, 2004).

Die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) ist eine seltene, langsame progrediente neurologische Masern-Komplikation. Sie kommt mit einer Häufigkeit von 10^{-4} nach Infektionen mit Wildtyp-Masernvirusstämmen und vor allem bei Kindern, die vor dem zweiten Lebensjahr mit MV infiziert waren, vor (Jabbour *et al.*, 1972; Detels *et al.*, 1973; Rima & Duprex, 2005). Der Verlauf der SSPE ist variabel und die Inkubationszeit beträgt 5 bis 10 Jahre (Modlin *et al.*, 1977 a,b). Die neurologische Symptomatik manifestiert sich durch motorische Dysfunktionen wie Dyspraxie, Konvulsionen, Aphasie, optische Ausfallerscheinungen und repetitive Myoklonien. 75 % der Fälle entwickeln eine Chorioretinitis mit nachfolgender Blindheit. Im fortgeschrittenen Stadium zeigt sich dann eine progressive zerebrale Degeneration, die zum Koma und letztlich zum Exitus führt. Neuropathologisch kann man anmerken, dass die Erkrankung zu einer diffusen Enzephalitis in der grauen und weißen Substanz mit perivaskulären und diffusen Lymphozyteninfiltraten und Gliosen führt. Aggregate viraler Nukleokapsidstrukturen sind in zerebralen Endothelzellen, Astrozyten, Neuronen und Oligodendrozyten, jedoch in keinen Riesenzellen, nachweisbar (Garg, 2002; Schneider-Schaulies *et al.*, 1999, 2003).

In infizierten Zellen des ZNS lassen sich leicht virale MV-Nukleokapsidstrukturen finden, doch gelingt die Rückisolierung infektiöser MV in Gewebekultur nur selten. Untersuchungen an isolierten MV aus unterschiedlichen SSPE-Gehirnen zeigten, dass diese Punkt- und Hypermutationen aufwiesen. Vor allem Veränderungen in jedem der drei membranassoziierten viralen Strukturkomponenten, dem Fusion-, dem Hämagglutinin- und dem Matrixprotein, konnten nachgewiesen werden (Cattaneo & Billeter, 1992; Schneider-Schaulies *et al.*, 1992; Billeter *et al.*, 1994; Norrby & Kristensson, 1997).

Besonders hervorzuheben ist, dass die Masernimpfung das Auftreten der SSPE völlig verhindert und die Frequenz der akuten postinfektiösen MV-Enzephalitis auf 10^{-6} reduzieren kann (Duclos & Ward, 1998).

1.2 Die Biologie des Masernvirus (MV)

1.2.1 Taxonomie

Das Masernvirus gehört zur Ordnung der *Mononegavirales*, zur Familie der *Paramyxoviridae* und zum Genus der *Morbillivirus*.

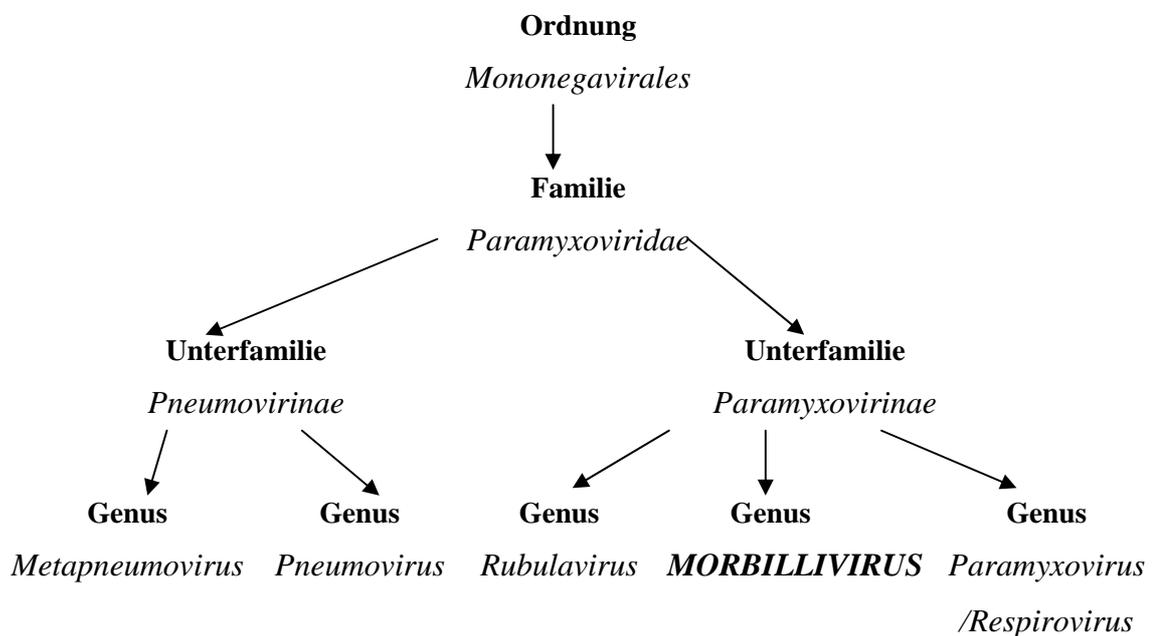


Abbildung 1.1: Übersicht über die Taxonomie der Ordnung *Mononegavirales*.

Die Familie der *Paramyxoviridae* wird in die zwei Unterfamilien der *Pneumovirinae* und der *Paramyxovirinae* unterteilt.

Im Jahre 2000 wurde die Familie der *Paramyxoviridae* in zwei Unterfamilien, den *Pneumovirinae* und den *Paramyxovirinae*, unterteilt (Lamb & Kolakofsky, 2001). Zu dieser Familie gehören wichtige Erreger für Kinderkrankheiten. Zu nennen sind die humanen Parainfluenzaviren (PIVs), das Mumps Virus (MuV), das Respiratorische Syncytial Virus (RSV) und das kürzlich entdeckte Nipah Virus, das 1999 in Malaysia und Singapur zu fatalen Enzephalitiden führte (Farrar 1999; Harcourt *et al.*, 2000).

Das MV ist ein einzelsträngiges RNA-Virus, dessen Genom in Negativstrangrichtung orientiert ist. Zusammen mit dem Rinderpestvirus (RPV), dem Peste des petits ruminants Virus (PPRV), dem Hundestaupavirus (CDV), dem Seehundestaupavirus (PDV-1 und PDV-2), dem Delphin Virus (DMV) und Tümmler Virus (PMV) gehört das Masernvirus (MV) zu den Morbilliviren.

Virus (Abkürzung)	natürlicher Wirt	experimentelle Infektion
Masern (MV)	Mensch	Primaten, Halbaffen, Frettchen, Ratte, Hamster, Maus
Rinderpest (RPV)	Büffel, Kuh, Giraffe, Schaf, Ziege, Schwein	Kaninchen
Peste des petits ruminants (PPRV)	Gazelle, Schaf, Ziege	Schwein
Hundestaube (CDV) (canine distemper)	Hund, Löwe, Fuchs, Frettchen, Waschbär	Schwein, Katze, Hamster, Maus
Seehundestaube (PDV) (phocine distemper)	Seehund	Hund, Nerz
Delphin Virus (DMV) (dolphin morbillivirus)	Delphin	Kuh, Schaf, Ziege, Hund
Tümmler Virus (PMV) (porpoise morbillivirus)	Tümmler	Kuh, Schaf, Ziege, Hund

Tabelle 1.1: Auflistung der Morbilliviren, ihrer natürlichen Wirte und der weiteren Möglichkeiten der experimentellen Infektion (verändert nach Schneider-Schaulies, 1999).

1.2.2 Morphologie

MV sind hoch pleomorphe Partikel mit einem Durchmesser von 120 bis 250 nm. In elektronenmikroskopischen Aufnahmen erkennt man Virionen, deren Virushülle von einer Lipiddoppelschicht mit 10 bis 20 nm Dicke gebildet wird, in welcher die viralen Glykoproteine mit einer Länge von 5 bis 8 nm eingelagert sind. Im Inneren der Virionen

befindet sich ein helikaler viraler Ribonukleoproteinkomplex (RNP-Komplex) mit einem Durchmesser von 17 nm.

MV bestehen aus sechs Strukturproteinen. Die Virushülle wird durch eine von der Zelle stammenden Membran gebildet an der das M (Matrix)-Protein angelagert ist und in welcher die viralen Transmembranglykoproteine F (Fusion)-Protein und das H (Hämagglutinin)-Protein eingelagert sind. Der RNP-Komplex wird von dem N (Nukleo)-Protein, dem P (Phospho)-Protein, dem L (Large)-Protein und der nicht segmentierten, einzelsträngigen RNA negativer Polarität von ca. 16 kb Länge gebildet.

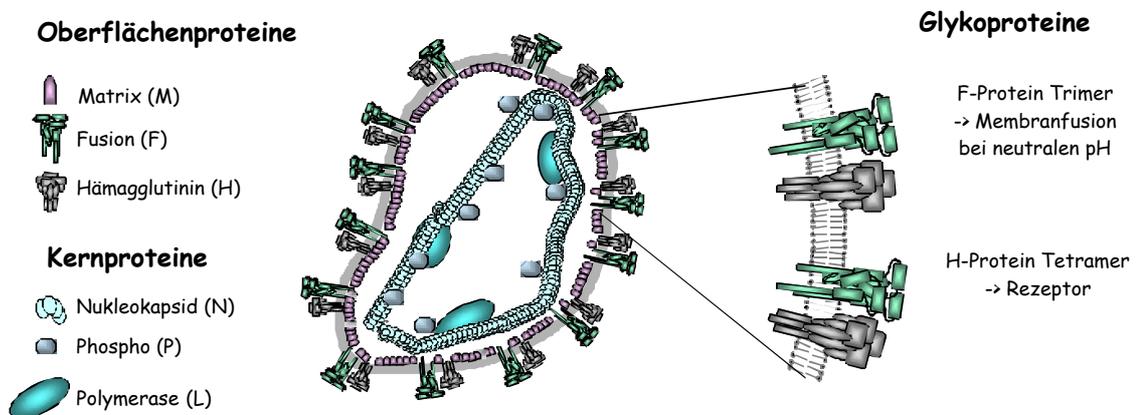


Abbildung 1.2: Schematische Abbildung eines Masernvirions mit gesonderter Auflistung der Oberflächen- und Kernproteine

(Schneider-Schaulies et al., 2003; gezeichnet von Dr. I. M. Klagge).

1.2.3 Die Proteine des MV

Das MV-Genom besteht aus sechs Genen, deren offene Leseraster für sechs Strukturproteine und zwei nicht im Virion vorkommenden Proteine codieren.

Beginnend am 3'-Ende ist das **NUKLEOPROTEIN** (N, 60 kDa) das häufigste aller viralen Translationsprodukte. Es kann sowohl mit der antigenomischen RNA {(+)-RNA} als auch mit der genomischen RNA {(-)-RNA} assoziieren. Über das aminoternale Ende lagert es sich an die RNA. Durch diese Verpackung, vermittelt durch das N-Protein (deswegen auch Nukleokapsid-Protein genannt), wird die RNA vor Abbau durch zelluläre Nukleasen geschützt. Mit dem carboxyterminalen Ende

interagiert das N-Protein mit den P- und L-Proteinen. Das für die Transkription und Replikation unwichtige 24 Aminosäuren lange C-terminale Ende des N-Proteins stellt eine regulatorische Domäne dar. Diese enthält ein funktionelles Motiv, welches eine direkte Wechselwirkung mit dem Hitzeschockprotein (Hsp72) vermittelt (Zhang *et al.*, 2002).

Das **PHOSPHOPROTEIN** (P, 70 kDa) ist das zweithäufigste Translationsprodukt. Als Transaktivator für das Largeprotein liegt es an transkriptionsaktiven Stellen vor. Das konservierte C-terminale Ende enthält für die Transkription wichtige Regionen, die Polymerase-Bindungs-Region (Smallwood *et al.*, 1994) und die Regionsequenzen, welche für die RNP-Bindung verantwortlich sind (Harty & Palese, 1995). Das MV P-Gen codiert für zwei zusätzliche Proteine, das C-Protein und das V-Protein.

Das C-Protein der MV besteht aus 186 Aminosäuren und wird bei der Translation eines offenen Leserasters, das 22 Nukleotide stromabwärts des P/V Startcodons beginnt, gebildet (Richardson *et al.*, 1985). Es kolokalisiert mit dem MV RNP-Komplex in infizierten Zellen (Bellini *et al.*, 1985). Hinzu wird es für eine effiziente Vermehrung in humanen peripheren Blutlymphozyten (PBMC) benötigt (Escoffier *et al.*, 1999) und hemmt die Typ I-Interferonantwort (Shaffer *et al.*, 2003). Versuche zeigten, dass das MV C-Protein in Abwesenheit anderer MV Proteine die Induktion von IFN α/β oder von IFN α/β -stimulierten Genen hemmen kann. Weiterhin ist die Expression von STAT1 in PBMC, die mit MV ohne C Protein infiziert werden, deutlich höher (48,5 %) als mit Edmonston-tag infizierten PBMC (14,3 %) (Shaffer *et al.*, 2003).

Das V-Protein besitzt ein 68 Aminosäuren langes hoch konserviertes C-terminales Ende, das als Zink-Bindungsdomäne fungiert (Paterson *et al.*, 1995). Die V-Proteine der *Paramyxoviridae* sind nicht notwendig für die Replikation *in vitro* (Schneider *et al.*, 1997), aber essentiell für die Virulenz (Kato *et al.*, 1997; Devaux & Cattaneo, 2004). Das MV V-Protein hemmt auch den Typ I-Interferon Signalweg (Palosaari *et al.*, 2003). Wenn es konstitutiv in HeLa Zellen exprimiert wird, inhibiert es die Tyrosin Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 (Takeuchi *et al.*, 2003). Es bindet sowohl an STAT1, STAT2, STAT3 als auch IRF-9 und verhindert darüber hinaus noch die nukleäre Akkumulation der STAT Moleküle (Palosaari *et al.*, 2003).

Das **MATRIXPROTEIN** (M, 37 kDa) ist das dritthäufigste Translationsprodukt. Es besitzt basische und hydrophobe Eigenschaften, womit es mit dem N-Protein und der

Plasmamembran assoziieren kann. Es verbindet den RNP-Komplex mit der Virushülle und bildet die Proteinschicht an der Membraninnenseite. Zudem ist das M-Protein am Assembly der Viruspartikel beteiligt und für die apikale Freisetzung in Epithelzellen verantwortlich (Naim *et al.*, 2000). Bei persistierenden MV-Infektionen wie SSPE und MIBE wurden Mutationen insbesondere im M-Gen gefunden (Suryanarayana *et al.*, 1994).

Das **HÄMAGGLUTININPROTEIN** (H, 80 kDa) ist ein Typ II-Transmembranglykoprotein. Es wird als Tetramer auf der Virusoberfläche exprimiert (Malvoisin & Wild, 1993) und ist für die Bindung an die zellulären Rezeptoren verantwortlich. Der Name Hämagglutinin-Protein geht zurück auf die *in vitro* Hämagglutination von Affenerythrozyten durch MV-Impfviren, die den zellulären Rezeptor CD46 auf der Oberfläche besitzen (Seya *et al.*, 1998). Das H-Protein besitzt am aminoterminalen Ende eine hydrophobe Sequenz, die als Signalsequenz zum Transport in das Endoplasmatische Retikulum (ER) dient. Die Synthese und Glykosylierung erfolgt im rauhen ER. Dann erfolgt der Transport als Dimer, verbunden über Disulfidbrücken, zum Golgi-Apparat. Dort kommt es zur Modifikation der Zuckerreste. Hervorzuheben ist, daß das H-Protein fünf bis sechs Glykosylierungsstellen besitzt, um die optimale Proteinfaltung und -dimerisierung zu gewährleisten und um aus dem Golgi-Apparat exportiert zu werden (Hu *et al.*, 1994 a,b,c). Anschließend wird das H-Protein zur Zytoplasmamembran der Wirtszelle transportiert und erscheint als Tetramer auf der Virushülle.

Das **FUSIONSPROTEIN** (F, 60 kDa) ist ein Typ I-Transmembranglykoprotein und wird als Homotrimer oder Homotetramer auf der Virusoberfläche exprimiert (Malvoisin & Wild, 1993; Russel *et al.*, 1994). Es dient zusammen mit dem H-Protein zur Verschmelzung des viralen Envelope mit der Zytoplasmamembran der Zielzelle (Wild *et al.*, 1991). Das F-Protein wird als inaktives Vorläuferprotein (F₀, 60 kDa) im ER synthetisiert und glykosyliert. Durch eine Endoprotease (Furin) wird das F₀-Protein im Golgi-Apparat in zwei Untereinheiten F₁ (40kDa) und F₂ (20kDa) gespalten, die aber über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Die F₁-Protein-Untereinheit entstammt dem carboxyterminalen Ende des F₀-Proteins und ist in der Virushülle verankert. Das aminoterminalen Ende des F₁-Proteins enthält eine hydrophobe hoch konservierte Region, das fusionsaktive Peptid (Richardson *et al.*, 1986). Der extrazelluläre Teil des

F₁-Proteins besitzt in der Nähe der Transmembrandomäne ein Leuzinzippermotiv sowie eine cysteinreiche Region. Die F₂ Untereinheit enthält drei N-Glykosylierungsstellen, die für die Reifung, die Spaltung und die Funktion des F-Protein notwendig sind (Hu *et al.*, 1995).

1.2.4 Genomaufbau und Replikation

Das Genom der Masernviren ist nicht segmentiert und hat eine Länge von ungefähr 16 kb. Am 3'-Ende des Genoms befindet sich eine als Leader bezeichnete Sequenzfolge aus 36 Basenpaaren, die nicht für Aminosäuren kodiert. Der Leadersequenz folgen die proteinkodierenden Sequenzen der Strukturgene in der Reihenfolge 3'- N-P/C/V-M-F-H-L - 5'. Am 5'-Ende befindet sich ein als Trailer bezeichneter, nichttranskribierter Bereich, in dem die *cis*-aktiven Initiationssignale für den Synthesestart neuer Genomstränge während der Virusreplikation liegen (Sidhu *et al.*, 1995; Parks *et al.*, 2001 a,b). Die Leadersequenz dient zur Anlagerung des Polymerasekomplexes und damit zur Initiation der Transkription.

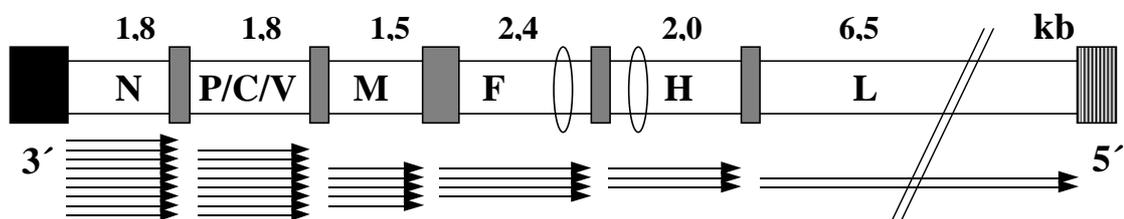


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung des MV-Genoms mit Transkriptionsgradient.

Das Genom beginnt am 3'-Ende mit der Leadersequenz (schwarz) und endet mit einer Trailersequenz am 5'-Ende (gestrichelt). Zwischen den einzelnen Genen für die Strukturproteine liegen die intergenischen Regionen (IGS) (graue Balken). Die darüberliegenden Zahlen geben die kb-Größe der einzelnen Strukturgene an. Die Transmembranregionen des F- und des H-Proteins sind als Elypse dargestellt. Die darunterliegenden Pfeile geben den Transkriptionsgradienten wieder.

Zwischen den proteinkodierenden Sequenzen befinden sich jeweils kurze intergenische Sequenzen (*intergenic sequences*; IGS), die nicht für Proteine kodieren. Diese Konsensussequenzen sind konservierte Tripeptide mit der Sequenz C-U/G-U. Sie

können sowohl zur Beendigung der Transkription genutzt als auch zur Synthese bi- oder polyzistronischer Transkripte überlesen werden. Das Überspringen dieser IGS und der erneute Transkriptionsstart führt zu sechs verschiedenen mRNAs, die "gecappt" und polyadenyliert werden. Je weiter ein Protein vom 3'-Ende entfernt ist, desto wahrscheinlicher wird eine vorzeitige Termination. Dadurch entsteht ein Transkriptionsgradient (siehe Abbildung 1.3) von 3' nach 5', welcher nach der Translation für große Mengen an N-Protein, aber nur wenig L-Protein sorgt (Cattaneo *et al.*, 1987; Schneider-Schaulies *et al.*, 1990).

Die viralen mRNAs werden vom zellulären Translationsapparat translatiert. Auch die zusätzlichen Modifikationen des F- und H-Proteins greifen auf zelluläre Mechanismen des ER zurück. Für das Umschalten von Transkription auf die Replikation des Genoms ist eine ausreichende Menge des N-Proteins im Zytoplasma notwendig. Die Bildung eines neuen Virusgenoms setzt ein durchgehendes RNA-Molekül in Positivstrangorientierung (Antigenom) voraus. Dies geschieht, indem sich das N-Protein an die RNA anlagert und dadurch eine Antitermination an den Stop-Sequenzen der Proteine bewirkt (Blumberg *et al.*, 1981). Unterstützt wird diese Antitermination zudem durch eine Komplexbildung der N- und P-Proteine, die durch Wechselwirkungen mit dem L-Protein die Entstehung des Antigenoms fördert.

Zur Freisetzung neuer Viruspartikel lagern sich die M-Proteine an die Innenseite der Zytoplasmamembran an und wechselwirken mit den dort lokalisierten F- und H-Proteinen, wodurch eine Matrixschicht ausgebildet wird. Diese interagiert wiederum mit dem RNP-Komplex. Die Viruspartikel werden durch Budding oder Lyse der Zelle freigesetzt. Dadurch erfolgt eine Infektion weiterer benachbarter Zellen (Manie *et al.*, 2000).

Die erneute Infektion beginnt mit dem ersten Schritt in der Replikation durch die Adsorption des H-Proteins an den zellulären Rezeptor. Anschließend erfolgt eine Konformationsänderung der F-Proteine. Dabei verankern sich die hydrophoben Anteile des F-Proteins in der Zellmembran, so daß eine Fusion zwischen dem Virusenvelope und der Membran der Wirtszelle herbeigeführt wird. Durch den Mechanismus der Fusion ist die Aufnahme der viralen RNA pH-unabhängig. Bei der anschließenden Penetration kommt das Nukleokapsid mit der negativsträngigen RNA in das Zytoplasma der Zellen (*uncoating*).

1.3 Zelluläre Rezeptoren für MV

1.3.1 Vorkommen, Struktur und Funktion von CD46

CD46 oder auch Membran Cofaktor Protein (MCP) wurde 1985 als ein Regulator aus der Proteinfamilie der Komplementrezeptoren (*regulators of complement activation* = RCA) identifiziert (Liszewski *et al.*, 1996). Im Jahre 1993 wurde CD46 dann als Rezeptor für MV-Impfstämme identifiziert (Dörig *et al.*, 1993; Naniche *et al.*, 1993 a,b). CD46 wird ubiquitär auf allen humanen Zellen, außer Erythrozyten (Cole *et al.*, 1985) und auch wenig im ZNS (Ogata *et al.*, 1997) exprimiert. Als intrinsisches Regulator-protein bindet CD46 an die Faktoren C3b und C4b des Komplements und fördert deren Spaltung durch Faktor I, eine Serinprotease des Plasmas, um so körpereigene Zellen vor der Lyse durch das autologe Komplementsystem zu schützen (Liszewski *et al.*, 1991; Oglesby *et al.*, 1992; Loveland *et al.*, 1993). Auf Granulozyten und Lymphozyten liegt die Kopienzahl bei 5 bis 10×10^3 Molekülen pro Zelle. Bei Blutplättchen hingegen findet man pro Zelle nur 700 bis 2500 Moleküle. Epithelzellen tragen 5×10^5 Kopien und einige Tumorzellen sogar 1×10^6 (Seya *et al.*, 1990 a,b). Betrachtet man Alt- und Neuweltaffen wird CD46 auch auf Erythrozyten exprimiert (Nickells *et al.*, 1990). Diese Eigenschaft wird beim Hämagglutinationstest genutzt. CD46 wirkt nicht nur als Komplementinhibitor, sondern ist auch an der Reproduktion bzw. Fertilisation beteiligt. In den humanen Spermatozoen ist die CD46-Expression auf die innere akrosomale Membran (IAM), welche nach der Bindung der männlichen Keimzelle der *Zona Pellucida* der weiblichen Eizelle exponiert ist, beschränkt (Riley-Vargas *et al.*, 2003). Humane Spermatozoen exprimieren nur eine bestimmte Isoform von CD46, jene mit geringer O-Glykosylierung und mit der cytoplasmatischen Variante CYT-2 (Riley *et al.*, 2002). Deshalb wird eine CD46-Fehlexpression mit Infertilität in Zusammenhang gebracht (Kitamura *et al.*, 1997; Nomura *et al.*, 2001). Ferner ist CD46 auch noch ein Ziel von anti-Spermien Antikörper (Jiang & Pillai, 1998). Eine Defizienz an CD46 äußert sich im Hämolytisch-urämisches Syndrom (HUS) (Richards *et al.*, 2003; Noris *et al.*, 2003; Goodship *et al.*, 2004), einer Erbkrankheit, bei

der es zu schwerwiegenden Schädigungen der Blutgefäße, Blutzellen und der Nieren kommt.

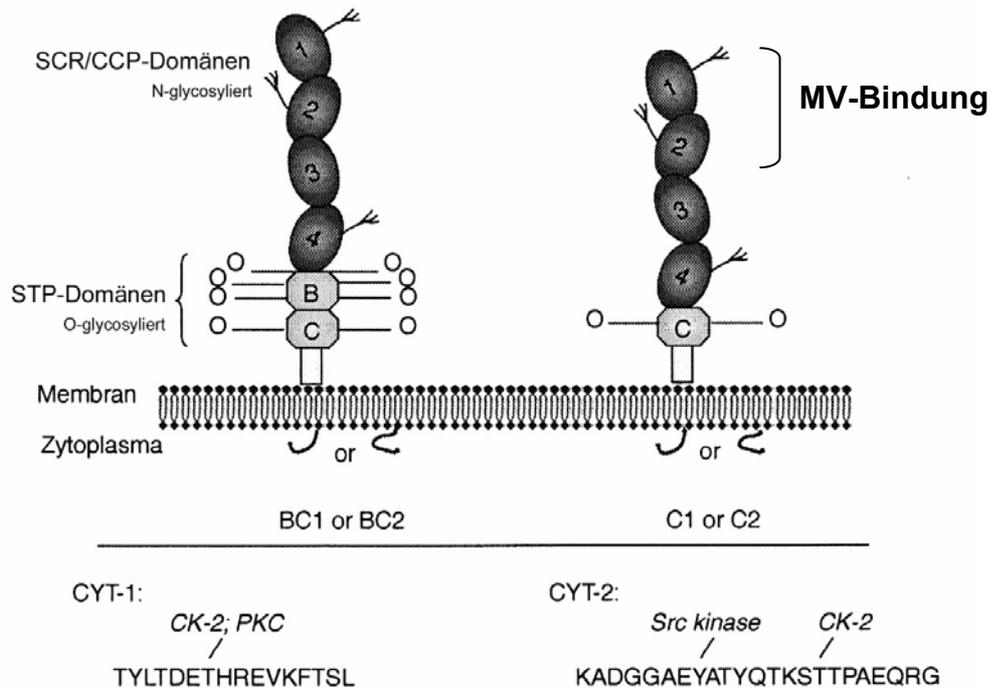


Abbildung 1.4: Schematische Struktur unterschiedlicher Isoformen von MCP(CD46).

CD46 ist ein Typ I Transmembranglykoprotein. Es werden vier Hauptisoformen exprimiert, die durch alternatives Spleißen aus einem einzelnen Gen entstehen. Diese Isoformen unterscheiden sich in der Anzahl der Juxtamembran-*O*-Glykosylierung und in der Expression der cytoplasmatischen Enden (CYT-1 oder CYT-2), welche verschiedene Signalmotive enthalten (Seya *et al.*, 1999). Masernviren binden an die SCR/CCP-Domänen 1 bis 2 und die Komplementfaktoren hingegen an die SCR/CCP-Domänen 1 bis 4 (verändert nach Riley-Vargas *et al.*, 2004).

Das CD46-Gen wird auf dem humanen Chromosom 1q32 kodiert, ist 46 kb groß und enthält 14 Exons. Exon 1 codiert für die Leader-Signalsequenz, gefolgt von den 4 Komplement-Kontroll-Protein Domänen 1 bis 4 (SCR, *short consensus repeats* oder CCPs, *complement control protein repeats*, 251 As), die von den Exons 2 bis 6 codiert werden. Die Exons 7 bis 9 codieren für ein bis drei *O*-glykosylierte Serin-Threonin-Prolin-reichen Domänen (STP^A, STP^B, STP^C, 44 As). Das Exon 10 codiert für eine Sequenz mit unbekannter Signifikanz (UK, 13 As). Exon 11 und Exon 12 codieren für

die Transmembran-Domäne (34 As) und die Exons 13 und 14 codieren für die zytoplasmatische Domäne, die durch alternatives Spleißen in zwei Varianten exprimiert werden kann (CYT-1 mit 16 As und CYT-2 mit 23 As). Dazu enthält jede der beiden Varianten einzelne definierte Signalmotive, wobei der cytoplasmatische Teil 2 (CYT-2) in der humanen T-Zelllinie Jurkat durch die src-Kinase Ick an einem Tyrosinrest phosphoryliert wird (Wang *et al.*, 2000). CD46-Vernetzung auf primären humanen CD4⁺ T-Lymphozyten induziert die Aktivierung von Vav und Rac sowie auch die Phosphorylierung der Mitogen-aktivierten Proteinkinase Erk (Zaffran *et al.*, 2001) und der Adaptorproteine p120CLB und LAT (Astier *et al.*, 2000). Jeder Mensch exprimiert mehrere höher- und mehrere niedermolekulare Isoformen und das Verhältnis davon wird autosomal dominant vererbt. In der Population herrschen drei Phänotypen vor: 65 % exprimieren vorwiegend die höhermolekulare O-glykosylierte 65 kDa Form, die vor allem im Gehirn und in männlichen Spermien exprimiert wird, 6 % exprimieren vorwiegend die niedermolekulare O-glykosylierte 55 kDa Form, die in den Nieren exprimiert wird, und 29 % exprimieren beide Formen in annähernd in gleicher Weise (Wilton *et al.*, 1992; Johnstone *et al.*, 1993 a,b; Seya *et al.*, 1999; Riley-Vargas *et al.*, 2004) Die Exons 7 und 8, die für die STP^A, STP^B und STP^C Domänen codieren, können alternativ gespleißt werden. Die Expression von STP^B führt zur Expression der höhermolekularen Variante mit 66 kDa und das Fehlen von STP^B in den Isoformen führt zur niedermolekularen Variante mit 56 kDa (Liszewski *et al.*, 1991, 1994; Manchester *et al.*, 1994).

Durch CD46-MV Interaktionsstudien mittels Peptidkartierung, Austauschmutagenese, blockierenden Antikörper und kristallographischen Analysen wurde die MV-Bindungsstelle gefunden (Casanovas *et al.*, 1999). Bei der Infektion durch MV binden die H-Proteine an die äußeren SCR/CCP-Domänen (SCR/CCP 1 bis 2) und können dann mittels Rezeptor-vermittelter Membranfusion in die Zelle gelangen (Buchholz *et al.*, 1996; Devaux *et al.*, 1996; Maisner *et al.*, 1996; Manchester *et al.*, 1994). Alle Isoformen von CD46 sind in der Lage als MV-Rezeptor zu fungieren (Gerlier *et al.*, 1994; Manchester *et al.*, 1994; Varior-Krishnan *et al.*, 1994). Nachfolgend wird CD46 in Abhängigkeit von dem MV-Stamm von der Zelloberfläche herunterreguliert (Naniche *et al.*, 1993 a,b; Krantic *et al.*, 1995; Schneider-Schaulies *et al.*, 1995 a,b; Bartz *et al.*, 1996; Galbraith *et al.*, 1998). Ferner führt diese MV-induzierte CD46-

Modulation zu einer verstärkten Komplementanfälligkeit der infizierten Zelle (Schnorr *et al.*, 1995). Die Ligation von CD46 auf humanen primären Monocyten mit monoklonalen Antikörpern, C3b Dimeren oder MV, führt zu einer Modulation von Interleukin-12 p70 und p40. Diese Wirkungsweise wird als ein möglicher Mechanismus für die Masern induzierte Immunsuppression angesehen (Karp *et al.*, 1996). CD46 interagiert auch mit β 1-Intergrinen, mit kostimulatorischen Molekülen wie Tetraspanine (Kurita-Taniguchi *et al.*, 2002; Lozahic *et al.*, 2000) und mit DLG4 (Ludford-Menting *et al.*, 2002).

Erreger	Ligand	Interaktions- domäne	Wechselwirkung
Adenoviren (Gruppe B und D)	Knob		Endozytose
BVDV (bovine viral diarrhea virus)	E2		Endozytose ?
Humanes Herpesvirus 6	Glykoproteinkomplex (H, L + Q)	CCPs 2 + 3	Bindung
Masernviren	Hämagglutinin	CCPs 1 - 2	Bindung
<i>Neisseria gonorrhoeae</i> <i>Neisseria meningitides</i>	Typ IV Pilus	CCPs 3 + 4	Adhäsion
<i>Streptococcus pyogenes</i>	M Protein	CCPs 3 + 4	

Tabelle 1.2: Zusammenfassung der Wechselwirkungen von verschiedenen Erregern mit dem Typ I Transmembranglykoprotein CD46.

Hervorzuheben ist, dass CD46 nicht nur als MV-Rezeptor fungiert, sondern auch als Rezeptor von drei weiteren Viren: den Adenoviren (Gaggar *et al.*, 2003; Segerman *et al.*, 2003), BVDV (Maurer *et al.*, 2004) und Humanes Herpesvirus 6 (Santoro *et al.*, 1999). Außerdem kann CD46 von zwei Bakterienstämmen wie *Neisseria* (Kallstrom *et al.*, 1997) und *Streptococcus* (Okada *et al.*, 1995) als Eintrittspforte benutzt werden kann (Cattaneo *et al.*, 2004; Riley-Vergas *et al.*, 2004).

1.3.2 Vorkommen, Struktur und Funktion von SLAM

CD150 oder auch *signaling lymphocyte-activation molecule* (SLAM) wurde 1995 als humaner Rezeptor zur T-Zell-Aktivierung identifiziert (Cocks *et al.*, 1995). Als kostimulatorisches Molekül gehört das glykosylierte Transmembranoberflächenprotein zur CD2 Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie (Tangye *et al.*, 2000; Veillette & Latour, 2003). Im Jahre 2000 wurde SLAM als Rezeptor für Wildtyp-Masernviren identifiziert (Tatsuo *et al.*, 2000; Erlenhoefer *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2001). Weitere Mitglieder der Familie der Morbilliviren benutzen SLAM auch als Rezeptor (Tatsuo *et al.*, 2001). Das menschliche SLAM wird auf unreifen Thymozyten, T-Gedächtniszellen (CD45RO^{high}) und aktivierten B- und T-Lymphozyten exprimiert (Sidorenko & Clark, 1993; Cocks *et al.*, 1995; Aversa *et al.*, 1997). Lösliche und membrangebundene SLAM-Moleküle induzieren Immunglobulin-Synthese und Proliferation auf aktivierten humanen B-Zellen (Punnonen *et al.*, 1997). Außerdem findet man eine differentielle SLAM-Expression auf CD4 T-Zellen. Auf T-Helfer 1-Lymphozyten (TH1-Zellen) beobachtet man eine hohe und auf TH2-Zellen eine geringe Expression (Hamalainen *et al.*, 2000). Monozyten, die frisch aus PBMC isoliert werden, exprimieren kein SLAM auf der Oberfläche; nach Stimulation mit Mitogenen oder auch mit MV-Partikel alleine zeigt sich aber eine deutliche Expression (Minagawa *et al.*, 2001). Dazu wird SLAM auf reifen dendritischen Zellen (DZ) exprimiert. Unreife DZ besitzen kein SLAM (Polacino *et al.*, 1996; Bleharski *et al.*, 2001; Kruse *et al.*, 2001; Ohgimoto *et al.*, 2001). Generell kann auf Monozyten, Granulozyten und Zellen aus nicht-lymphatischen Organen kein SLAM nachgewiesen werden (Sidorenko & Clark, 1993; Cocks *et al.*, 1995; Aversa *et al.*, 1997). Ferner ist SLAM ein Selbstligand, wobei die Signalübertragung über homophile Interaktionen erfolgen kann (Mavaddat *et al.*, 2000). Die Bindung des monoklonalen Antikörpers A12 an SLAM führt zu einer IL-2-unabhängigen T-Zell-Expansion und zur IFN- γ -Produktion von aktivierten T-Zellen (Cocks *et al.*, 1995; Aversa *et al.*, 1997; Carballido *et al.*, 1997). Die Ligation von SLAM mit dem monoklonalen Antikörper IPO-3 verstärkt die Proliferation von B-Zellen, welche durch anti-CD40 und IL-4 induziert werden kann (Sidorenko & Clark, 1993). Zusätzlich wird die Synthese und Sekretion von Immunglobulinen gefördert (Punnonen *et al.*, 1997; Yanagi *et al.*, 2002).

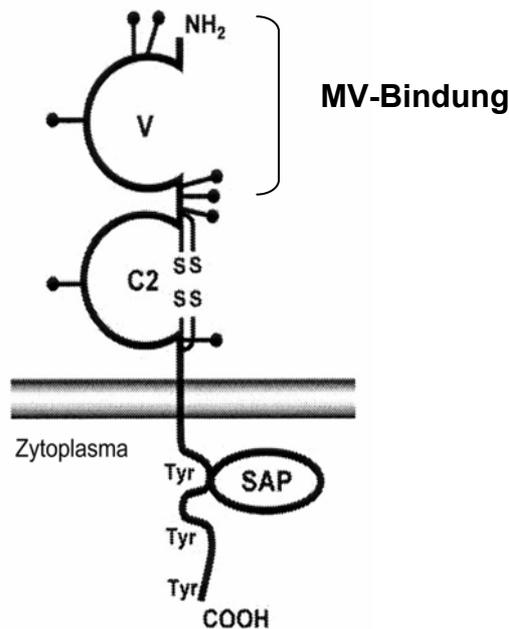


Abbildung 1.4: Schematische Struktur des humanen SLAM(CD150)-Proteins.

CD150 besitzt zwei hoch glykosylierte Immunglobulin-Superfamilie-Domänen, V und C2. Der cytoplasmatische Schwanz enthält drei Tyrosinreste, an denen SAP binden kann. Die V-Domäne ist für die Funktion als MV-Rezeptor essentiell (verändert nach Yanagi *et al.*, 2002).

Das humane Gen SLAMF1 (*signaling lymphocyte activation molecule family member 1*) wird auf dem Chromosom 1q22-q23 codiert. SLAM ist ein 70 kDa großes Transmembranglykoprotein mit einer 27 As langen hydrophoben Leader-Sequenz, einer 202 As langen extrazellulären Region, einer 22 As langen Transmembrandomäne und einer 77 As langen cytoplasmatischen Domäne (Cocks *et al.*, 1995). Der extrazelluläre Teil enthält zwei Domänen, eine V-ähnliche und eine C2-ähnliche. Die cytoplasmatische Domäne besitzt drei Tyrosinreste, welche von SH2-Bindesequenzen umgeben sind. Intrazellulär kann SLAM an das SLAM-assoziierte Protein SAP (auch als SH2D1A bekannt) und an die Tyrosinphosphatase SHIP (Sayos *et al.*, 1998; Shlapatska *et al.*, 2001) binden. Durch chimäre Moleküle wurden die funktionellen Domänen von SLAM für die Interaktion mit MV untersucht. Yanagi und Mitarbeiter konnten zeigen, dass die As-Positionen 58 bis 67 in der V-Domäne des humanen SLAM-Proteins fähig sind, als MV-Rezeptor zu fungieren, indem das lösliche SLAM mit der V-Domäne an

Zellen binden konnte, auf denen das H-Protein und nicht das F-Protein von MV exprimiert war (Richert *et al.*, 1983; Ono *et al.*, 2001; Ohno *et al.*, 2003).

Rezeptor	Isoform	Transkript	Verteilung	Referenz
SLAM	mSLAM	LVC ² TMTTaa	Zellmembran CD45RO ⁺ T-Zellen, unreife B + T-Zellen	Cocks <i>et al.</i> , 1995
	vmSLAM	LVC ² TMTT	Zellmembran CD45RO ⁺ T-Zellen, unreife B + T-Zellen	Cocks <i>et al.</i> , 1995
	cSLAM	VC ² TMTTT	Zytoplasmatisch	Aversa <i>et al.</i> ,
	sSLAM	LVC ² TTTaa	Sekretorisch	1997

Tabelle 1.3: Verschiedene Isoformen von SLAM (verändert nach Dhiman *et al.*, 2004).

Das humane SLAM wird durch alternatives Spleißen in vier verschiedenen Isoformen exprimiert. Zwei davon sind membrangebunden, wobei erstere sich über die Gesamtlänge mit einem 10 As langen zytoplasmatischen Ende erstreckt und zweitere einen verkürzten zytoplasmatischen Schwanz mit nur zwei Tyrosinreste besitzt. Ferner wird SLAM auch als zytoplasmatisches Protein ohne Leadersequenz und als lösliches Protein, welchem die gesamte 30 As lange TM-Domäne fehlt, exprimiert (Cocks *et al.*, 1995; Aversa *et al.*, 1997; Punnonen *et al.*, 1997; Dhiman *et al.*, 2004).

Die biologische Bedeutung von SLAM wird dadurch hervorgehoben, daß Mutationen oder Deletionen im humanen SAP-Gen einen schweren Immundefekt, die X-gekoppelte Lymphoproliferative Erkrankung (XLP), hervorruft (Coffey *et al.*, 1998; Sayos *et al.*, 1998; Nichols *et al.*, 2000).

Die Infektion durch MV weist neben einer Immunsuppression auch eine Lympho(zyto)penie, d. h. einen verminderten Anteil an Lymphozyten im Vollblut auf. Es wird vermutet, daß dies durch die Infektion und die Zerstörung SLAM-exprimierender Zellen verursacht wird (Sidorenko & Clark, 2003; Dhiman *et al.*, 2004). SLAM wird genauso wie CD46 nach Infektion und Kontakt mit MV von der Zelloberfläche herabreguliert (Erlenhoefer *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2002) doch ist die durch MV induzierte Proliferationsinhibition der Wirtszellen SLAM-unabhängig (Erlenhoefer *et al.*, 2001).

Um die Rolle von SLAM in der MV Pathogenese besser verstehen zu können, wurde eine transgene Maus, die das humane SLAM exprimiert, gezüchtet. Die *in-vivo* Daten zeigen, dass MV - sowohl Wildtyp- als auch Impfstämme - SLAM positive Zellen infizieren, den Rezeptor von der Zelloberfläche herabregulieren und die Proliferationsinhibition induzieren (Hahm *et al.*, 2003).

1.4 Endothelzelltropismus der MV

Bei der akuten Masernerkrankung stellen Endothelzellen (EZ) und Epithelzellen wichtige Zielzellen dar. Die MV gelangen über den oberen Respirationstrakt in den Körper. Zuerst werden vermutlich die Epithelzellen der Atemwege infiziert. Das MV wird dann vorwiegend von dendritischen Zellen (DZ) in die lymphatischen Gewebe transportiert. Nach einer lytischen Virusvermehrung in den lokalen Lymphknoten kommt es zu einer virämischen Phase und einer Verbreitung des Virus im Körper. Über infizierte Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen werden Epithelzellen und Endothelzellen in verschiedenen Organen wie Leber, Niere, Gastrointestinaltrakt, Lunge und Haut infiziert (Griffin & Bellini, 1996).

Bei der hämatogenen systemischen Ausbreitung der Viren stellen Endo- und Epithelzellen eine Barriere zu den Organen dar. Zahlreiche Studien fokussieren sich vor allem auf die Überwindung der Blut-Hirn-Schranke durch Viren. Bei der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE) könnte der Transport der MV in das zentrale Nervensystem über die Infektion von EZ erfolgen. In den Gehirnen dieser Patienten wurden post mortem neben MV-infizierten Neuronen und Gliazellen auch MV-infizierte Endothelzellen gefunden (Allen *et al.*, 1996; Isaacson *et al.*, 1996; Kirk *et al.*, 1991).

1.5 Interferone

Interferone (*interferons*, IFNs) sind eine Familie niedermolekularer Proteine, die im Jahre 1957 von Isaacs und Lindenmann entdeckt wurden. Durch Experimente an virusinfizierten Hühnerembryonen fanden sie in der Chorioallantoismembran einen löslichen Faktor, der eine antivirale Aktivität in anderen Zellen induzierte (Isaacs & Lindenmann, 1957; Mester & Rouse, 1991). Deshalb wurde diese Substanz nach seiner Interferenz mit der Virusvermehrung als Interferon (IFN) bezeichnet.

1976 gelang es das erste Interferon zu reinigen und zu charakterisieren (Knight, 1976 a,b). Reine Interferonpräparationen zu erhalten war jedoch ein aufwendiges und schwieriges Unterfangen. Erst die Fortschritte in der Gentechnologie ermöglichten die Produktion rekombinant hergestellter Interferone in großen Mengen, um weitere biochemische und funktionelle Studien durchführen zu können.

Anfangs konzentrierte sich die Erforschung der Interferone auf die Untersuchung der antiviralen Eigenschaft. Es wurde untersucht, ob tierische Zellen bei Infektionen mit verschiedenen Viren, aber auch nach Kontakt mit Lipopolysacchariden von Bakterien, Interferone sezernieren. Erst Anfang der 80er Jahre beschäftigte man sich in Fachkreisen zunehmend mit den vielfältigen biologischen Wirkungsweisen der Interferone auf das Immunsystem und auf die Regulation des Zellwachstums (Taylor-Papadimitrou, 1980; Friedmann & Vogel, 1983). Interferone sind sehr potente Modulatoren unspezifischer und immunologisch spezifischer Abwehrmechanismen. Außerdem steigern sie die Aktivität von Monozyten, Makrophagen und natürlichen Killerzellen, fördern die Effekte von T-Lymphozyten und üben einen positiven oder negativen regulatorischen Einfluss auf die Antikörpersynthese durch B-Lymphozyten aus (Stark *et al.*, 1998).

1.5.1 Einteilung der Interferone

Namengebend für die Unterscheidung der Interferone war anfangs zunächst die zelluläre Herkunft. Man unterteilte sie in Leukozyten-, Fibroblasten- und Immun-Interferone.

Später wurden die Interferone in drei Hauptklassen eingeteilt:

Bezeichnung	Abkürzung	ältere Bezeichnungen
Interferon- α (alpha-Interferon)	IFN- α (α -IFN)	Leukozyten-IFN Typ-I-IFN
Interferon- β (beta-Interferon)	IFN- β (β -IFN)	Fibroblasten-IFN Typ-I-IFN
Interferon- γ (gamma-Interferon)	IFN- γ (γ -IFN)	Immun-IFN Typ-II-IFN

Tabelle 1.5: Die Nomenklatur der Interferone (verändert nach Stewart *et al.*, 1980).

IFN- α und IFN- β werden durch virale und bakterielle Infektionen von unterschiedlichen Zellarten sezerniert. Aufgrund ihrer hohen Temperatur- und Säurestabilität wurden sie zu den Typ I-Interferonen zusammengefasst. IFN- γ hingegen wird hauptsächlich von natürlichen Killerzellen (NK) (Trinchieri *et al.*, 1984) und von antigen- oder mitogenstimulierten T-Zellen (Bocci, 1988) sezerniert. Durch die Eigenschaft der Temperatur- und Säurestabilität wird IFN- γ als Typ II-Interferon bezeichnet.

Typ I- und Typ II-Interferone interagieren jeweils mit einem spezifischen Rezeptor (Mogensen *et al.*, 1999). Die beiden Rezeptorarten haben divergierende Signaltransduktionswege (Muller *et al.*, 1994; Stark *et al.*, 1998). Außerdem induzieren sie ein variierendes Set an Genen (Sen & Lengyel, 1992), wobei von beiden Subtypen die Wirkung in unterschiedlichem Grad induziert werden kann (Billiau, 1996).

1.5.1.1 Typ I-Interferone

Typ I-Interferone werden bevorzugt von Monozyten, Makrophagen, T- und B-Lymphozyten und Fibroblasten nach Stimulierung durch Viren, bakteriellen Komponenten oder auch Glukokortikoid-Hormonen und Nukleinsäuren sezerniert. Die intrazelluläre doppelsträngige (ds) RNS, die während der Replikation und Transkription des viralen Genoms gebildet wird, führt zu einer starken Induktion von IFN- α/β (Jacobs & Langland 1996).

In dieser Gruppe unterscheidet man fünf Mitglieder (α , β , κ , τ , ω). Interferon- α (alpha-Interferon) wurde als erstes menschliches Interferon kloniert (Weck *et al.*, 1981 a,b). Es ist ein aus 165/166 As bestehendes, einkettiges Zytokin. Im humanen System sind bisher 26 verschiedene Gen-Subtypen (*hIFN- α_1* bis *α_{26}*) mit 85 % Homologie bekannt, die auf dem Chromosom 9p22 lokalisiert sind. Diese codieren für etwa 12 verschiedene Proteine mit identischer Aminosäuresequenz an Positionen 115 bis 151 und mit einem besonders variablen NH₂-Ende. Die relative Molekülmasse schwankt zwischen 19 und 29 kDa (Zoon *et al.*, 1992).

Das humane Interferon- β (beta-Interferon) wurde im Jahre 1982 kloniert (Dworkin-Rastl *et al.*, 1982) und ist ein aus 166 As bestehendes einkettiges 20 kDa Glykoprotein. IFN- β wird bevorzugt von Fibroblasten, Makrophagen und epithelialen Zellen nach Stimulierung durch Viren, Nukleinsäuren, bakteriellen und anderen mikrobiellen Strukturen sowie durch Interleukin-1 oder Tumornekrosefaktoren sezerniert. Das Gen ist auf dem Chromosom 9p22 lokalisiert und ist in dem IFN- α -Gen-Komplex eingebettet. Bei IFN- β besteht auf Proteinebene 34 % Sequenzhomologie und auf genomischer Ebene 30 % Homologie zu den α -Interferonen (Derynck *et al.*, 1980 a,b). Auffällig bei den Genen für IFN- α und IFN- β ist, dass sie keine Introns besitzen (Zoon *et al.*, 1992). Ferner binden alle Typ I-Interferone an den gleichen Oberflächenrezeptor der Zielzellen (Lutfalla *et al.*, 1992).

Der Typ I-Interferon Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, IFNAR1 und IFNAR2 (Mogensen *et al.*, 1999), deren intrazelluläre Domäne einerseits mit den Tyrosinkinase Tyk2 (Colamonici *et al.*, 1994 a,b) und mit Jak1 andererseits (Novick *et al.*, 1994) assoziiert sind. STAT (*signal transducer and activator*)1 und STAT2 sind zuerst mit IFNAR2 verbunden (Li *et al.*, 1997). Nach Bindung von IFN- α/β an die beiden

Rezeptor-einheiten erfolgt die Tyrosinphosphorylierung und Aktivierung von Tyk2 und Jak1, indem Tyk2 die Aminosäure an Position 466 von IFNAR1 phosphoryliert. Anschließend kommt es zur Phosphorylierung von bestimmten Tyrosinresten an STAT1 und STAT2. Dann bilden diese ein Heterodimer und dringen zusammen mit p48 (*IFN-regulatory factor 9*; IRF-9) in den Kern ein (Veals *et al.*, 1992). Dieser Heterotrimer-Komplex wird als IFN-stimulierender Genfaktor 3 (*IFN-stimulated gene factor 3*; ISGF3) bezeichnet. Dieser bindet an bestimmte DNA-Sequenzelemente (*IFN-stimulated response elements*; ISREs) und aktiviert die Transkription von ISGs (*IFN-stimulated genes*) (Gotoh *et al.*, 2001).

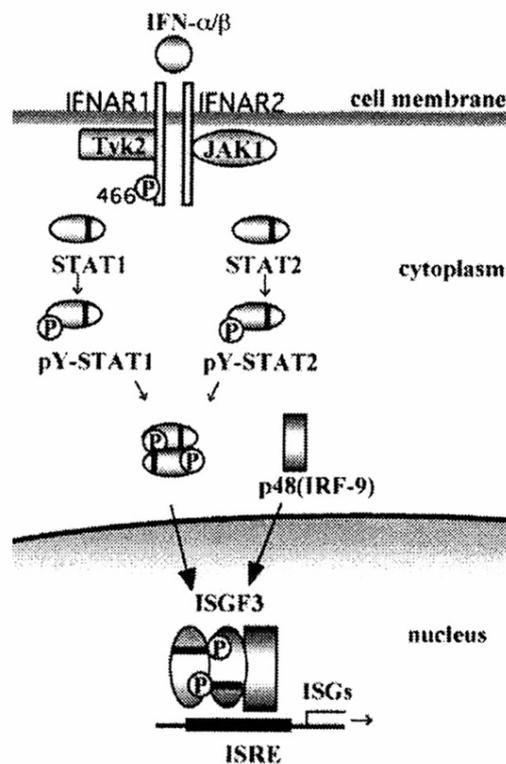


Abbildung 1.6: Schematisches Diagramm des Typ I-Interferon Signaltransduktionsweges (verändert nach Gotoh *et al.*, 2001).

1.5.1.2 Typ II-Interferone

1965 wurde erstmals der einzige Vertreter der Typ II-Interferone, IFN- γ , beschrieben (Wheelock, 1965). Dieser Faktor wird nur von aktivierten T-Lymphozyten und von natürlichen Killerzellen (NK) gebildet (Biron, 1997). Das humane Gen für IFN- γ besteht aus vier Exons und drei Introns (Gray *et al.*, 1983). Das IFN- γ -Protein ist ein Homodimer aus zwei identisch glykosylierten Polypeptidketten mit einer Größe zwischen 20 und 25 kDa. Diese bestehen aus je 143 Aminosäuren (Gray *et al.*, 1982 a, b). Aufgrund der homodimeren Form ist IFN- γ gegenüber niedrigen pH-Werten (pH < 5) und hohen Temperaturen (T > 50 °C) sehr empfindlich (Pace *et al.*, 1985 a,b).

Außer auf Erythrozyten ist der Rezeptor für IFN- γ (Bach *et al.*, 1997) beim Menschen und bei der Maus auf allen Zellen exprimiert (Aguet & Merlin, 1987). Der Typ II-Interferon-Rezeptor besteht aus zwei Untereinheiten, IFNGR1 und IFNGR2, die mit Jak1 und Jak2 assoziiert sind (Kotenko *et al.*, 1995). IFN- γ bindet an zwei IFNGR1 Untereinheiten, wodurch Bindungsstellen für zwei IFNGR2 Untereinheiten gebildet werden (Marsters *et al.*, 1995). Die Dimerisierung des IFN- γ -Rezeptors (Greenlund *et al.*, 1993) ist Voraussetzung für seine biologische Funktion (Fountoulakis *et al.*, 1992 a,b) und bewirkt die Transphosphorylierung und Aktivierung von Jak1 und Jak2 (Igarashi *et al.*, 1994). Daraufhin wird die As Tyrosin an Position 440 von IFNGR1 phosphoryliert. Diese As dient als Bindungsstelle für STAT1. Nach der Phosphorylierung von STAT1 (Shuai *et al.*, 1992; Shuai *et al.*, 1993 a,b) wird ein Homodimer gebildet, das als γ -aktivierter Faktor (*gamma-activated factor*; GAF) bezeichnet wird. Dieser Faktor dringt dann in den Zellkern ein und bindet an die γ -aktivierte Sequenz (*gamma-activated sequence*; GAS), um die Transkription von den ISGs (*IFN-stimulated genes*) zu aktivieren (Gotoh *et al.*, 2001).

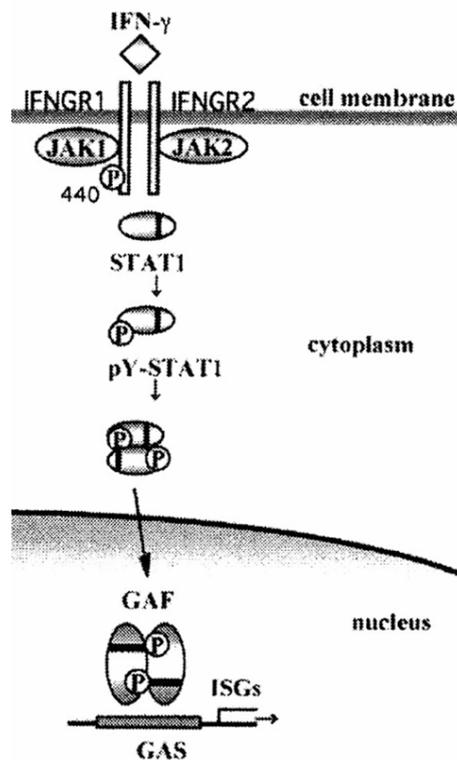


Abbildung 1.7: Schematisches Diagramm des Typ II-Interferon Signaltransduktionsweges (verändert nach Gotoh *et al.*, 2001).

1.5.2 Antivirale Aktivität von Interferonen

Untersuchungen zeigten, dass es bei den Interferonen zu einer Interferenz mit der viralen Replikation, d. h. zu einem frühen Eingreifen nahezu bei jeder Stufe der Virusvermehrung, kommt (Vilcek, 2003, 1993; Stark *et al.*, 1998).

Die antivirale Wirkung resultiert vor allem aus der Induktion bzw. den Funktionen der intrazellulären Proteinen, die von den IFN-stimulierenden Genen (ISGs) exprimiert werden. Zu diesen antiviralen Proteinen gehören insbesondere die Mx-Proteine (Horisbereger *et al.*, 1983; Arnheiter *et al.*, 1983), die Stickstoffoxidsynthase (NOS), die doppelsträngige (ds)-RNS abhängige Proteinkinase R (PKR) (Haines *et al.*, 1998; Clemens, 1997; Clemens & Elia, 1997) und die 2',5'-Oligoadenylatsynthetase (2'-5'OAS) (Gribaudo *et al.*, 1991; Castelli *et al.*, 1998).

Antivirales Protein	Wirkungsmechanismus	Empfängliche Viren
Mx	Inhibition der Transkription der viralen RNS	Influenza (Krug <i>et al.</i> , 1985; Pavlovic <i>et al.</i> , 1992) Masern (Patterson <i>et al.</i> , 2002; Pavlovic <i>et al.</i> , 1995; Schnorr <i>et al.</i> , 1993) VSV (Staheli <i>et al.</i> , 1991)
NOS	Nitrosylierung von Cystein- und Tyrosin-Resten und/oder Zerstörung von Sulfhydrylbrücken in viralen Proteinen	Coxsackie (Lowenstein <i>et al.</i> , 1996) EBV (Mannick <i>et al.</i> , 1994) HIV (Persichini <i>et al.</i> , 1998) HSV-1, VSV (Komatsu <i>et al.</i> , 1998) Vaccinia (Detels <i>et al.</i> , 1973)
PKR	Phosphorylierung von eIF2 α nach dsRNS Bindung (Inhibition der Translation)	ECMV (Iordanov <i>et al.</i> , 2000) HIV (Carpick <i>et al.</i> , 1997) VSV (Lee <i>et al.</i> , 1996; Khabar <i>et al.</i> , 2000)
RNaseL/2'-5'OAS	Synthese von Oligoadenylate nach dsRNS Bindung; Aktivierung von RNaseL; Degradierung von ssRNS	ECMV (Theerasurakarn <i>et al.</i> , 1998) HIV (Maitra <i>et al.</i> , 1998) Vaccinia Virus (Diaz-Guerra <i>et al.</i> , 1997)

Tabelle 1.4: IFN- γ induzierte antivirale Mechanismen
(verändert nach Chesler & Reiss, 2002)

Die Mx-Proteine sind große GTPasen und gehören zu der Dynamine-Superfamilie (Arnheiter *et al.*, 1983). Dynamine sind in der Zelle an wichtigen Prozessen wie der Endozytose, dem Vesikeltransport, der Morphologieerhaltung und Verteilung von Mitochondrien u.v.m. beteiligt (Praefcke & McMahan, 2004). Die Mx-Proteine sind je nach Spezies im Zytoplasma oder im Kern lokalisiert (Julkunen *et al.*, 2001). Die vielseitige antivirale Aktivität dieser ist abhängig von der jeweiligen Virusart, die untersucht wird (siehe Tabelle 1.4). Zum Beispiel ist das murine Mx1-Protein im Kern lokalisiert und inhibiert die Replikation von Orthomyxoviren zu Beginn der Transkription mit hoher Effizienz (Krug *et al.*, 1985). Das humane Mx1-Protein hingegen blockiert die Virusvermehrung in späteren Stadien der Replikation (Pavlovic *et al.*, 1992). Das Vesikuläre-Stomatitis-Virus aus der Familie der Rhabdoviren wird sowohl von humanen als auch von murinen Mx-Proteinen während der Replikation inhibiert (Arnheiter *et al.*, 1990; Staheli & Pavlovic, 1991).

Die Stickstoffoxidsynthase (NOS) und deren Produkt, Stickstoffoxid (NO) sowie dessen Reaktionsprodukt, ONOO⁻, werden als bedeutender antiviraler Mechanismus für eine Reihe an Viren in Verbindung gebracht (Chelser & Reiss, 2002). Als antivirale Eigenschaft von Stickstoffoxid, dessen Synthese im wesentlichen durch drei Isoenzyme der NO-Synthase (NOS I-III) katalysiert wird, ist vor allem die Nitrosylierung viraler Proteine während der Infektion hervorzuheben (Colasanti *et al.*, 1999; Bogdan, 2001). Dabei werden Cystein- und Tyrosinreste chemisch so modifiziert, dass dies zu einer Fehlfunktion, verursacht durch Zerstörung der Sulfhydrylbrücken und anschließender Protein-Missfaltung der Proteine, führt.

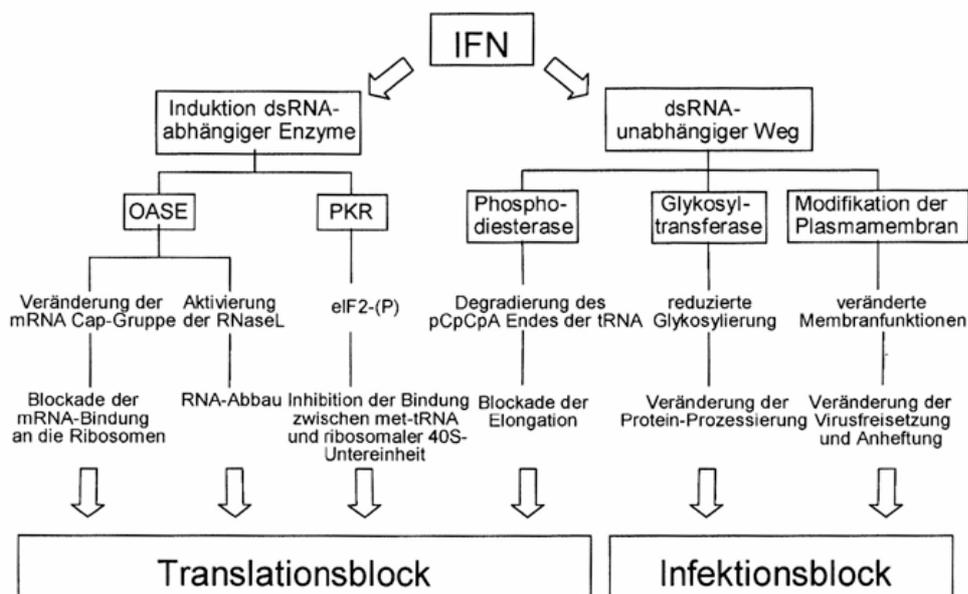


Abbildung 1.8: Antivirale Effekte von Interferonen.

Die Induktion der antiviralen Wirkung erfolgt über Interferon-aktivierte Gene, die einen dsRNA-abhängigen und einen –unabhängigen Weg verfolgen (verändert nach Bode & Hauser, 1990; Dissertation Andrea Kröger, Braunschweig, 1999).

Die PKR liegt als Serin/Threonin Proteinkinase, die mit Ribosomen assoziiert ist, zuerst als inaktive Form vor und wird durch die Bindung an ds-RNS aktiviert (Galabru & Hovanessian, 1987; Carpick *et al.*, 1997). Infolge dieser Aktivierung kommt es zu einer Hemmung der Translation von mRNS, da das eIF-2-Alpha-Protein inaktiviert wird. Dieser eukaryotische Initiationsfaktor ist in virusinfizierten Zellen für die virale

Proteinbiosynthese verantwortlich (Samuel, 1987; Lengyel, 1993). Außerdem kommt es durch die Aktivierung der PKR auch zu einer Degradation der zellulären mRNS.

Die 2'-5'-OAS wird ebenfalls durch ds-RNS aktiviert und synthetisiert 2'-5'-Oligoadenylate mit einer Länge von 2-10 Nukleotiden (Kerr & Brown, 1978), welche wiederum die in der Zelle latent vorkommende Ribonuclease L (RNase L) aktivieren (Silverman, 1994). Durch die RNase L werden je nach Virustyp und Art der infizierten Zellen neben viraler auch zelluläre mRNS degradiert (Slattery *et al.*, 1979; de Benedetti & Baglioni, 1984).

Es gibt noch einige Proteine, die durch Interferone induziert werden, deren Wirkung aber noch schlecht charakterisiert ist. Dazu gehört auch das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase, für das auch eine antivirale Wirkung beschrieben wurde.

1.6 Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO)

Die Indolamin 2,3-Dioxygenase (*indoleamine-pyrrole 2,3-dioxygenase*: EC 1.13.11.42) ist ein Enzym, welches in Anwesenheit von Sauerstoff den Abbau von L-Tryptophan (Trp) (auch von 5-Hydroxy-L-Tryptophan und von D-Tryptophan) zu L-N-Formylkynurenin und weiter zu Kynurenin katalysiert (Hirata *et al.*, 1975; Yamazaki *et al.*, 1985; Takikawa *et al.*, 1986). Der gesamte Abbauweg, besser bekannt als der Kynurenin-Stoffwechselweg, ereignet sich hauptsächlich in der Leber und führt zur vollständigen Oxidation von Tryptophan mit der Bildung von Adenosin-5'-triphosphat (ATP) und CO₂ als Endprodukten (siehe dazu Abbildung 1.9). Außerdem läßt sich dieser in drei Abschnitte und drei Seitenarme unterteilen. Der erste Abschnitt ist gekennzeichnet durch die Degradation von Tryptophan zu Kynurenin (Enzyme a-c), der zweite Abschnitt bewegt sich von Kynurenin zu Quinulinsäure (Enzyme e-g) und der dritte Abschnitt beinhaltet die Enzyme, die zur vollständigen Oxidation führen. Die drei Seitenarme des Kynureninstoffwechsels beinhalten erstens die Transaminierung zur Synthese von Kynureninsäure, zweitens die Bildung von Picolinsäure und drittens die Nicotin(säure)-amid-adenin-dinucleotid (NAD⁺) Synthese. Viele Körperzellen haben eine Auswahl der Enzyme innerhalb des Kynurenin-Stoffwechselweges, doch sind nur

Hepatozyten dafür bekannt, das komplette Set der benötigten Enzyme dieses Stoffwechselweges zu besitzen (Moffett & Namboodiri, 2003).

Nicotin(säure)-amid-adenin-dinucleotid (NAD^+) ist ein essentieller Cofaktor für viele zelluläre Reaktionen, die von der ATP Synthese bis hin zur DNA-Reparatur reichen. Die Synthese von ATP ist in allen Zellen von der ständigen Zufuhr von NAD^+ abhängig. Die Depletion an NAD^+ kann fatale Folgen für die Zelle haben. Die Aminosäure Trp stellt die einzige Quelle an Substrat für die *de novo*-Synthese von NAD^+ und die phosphorylierte Form NADP^+ in Abwesenheit von Niacin (Vitamin B_3) dar (Moffett & Namboodiri, 2003).

Trp ist somit eine essentielle Aminosäure, die bei allen Proteinbiosynthesen und bei wichtigen Stoffwechselfunktionen eine Rolle spielt. Säugetiere haben aber nicht die dafür notwendige enzymatische Maschinerie, um diese Aminosäure selbst zu synthetisieren. Die Primärproduzenten wie Bakterien, Pilze und Pflanzen hingegen bilden Trp aus den Molekülen wie Phosphoenolpyruvat. Deshalb muß Trp über die Nahrungskette aufgenommen und im Verdauungssystem hydrolysiert werden. Verdautes Trp gelangt dann über die Pfortader in die Leber und steht dort für die Proteinbiosynthese der Leber zur Verfügung.

Bei Mensch und Tier wird Trp im Nervensystem und im Darm vor allem als Substrat für die Synthese von Serotonin verwendet. In der Pinealdrüse hingegen wird Tryptophan zur Synthese von Melatonin benötigt. Daher spielt Trp als eine essentielle Substratquelle für die Bildung verschiedener Moleküle eine wichtige Rolle im Proteinstoffwechsel (Moffett & Namboodiri, 2003).

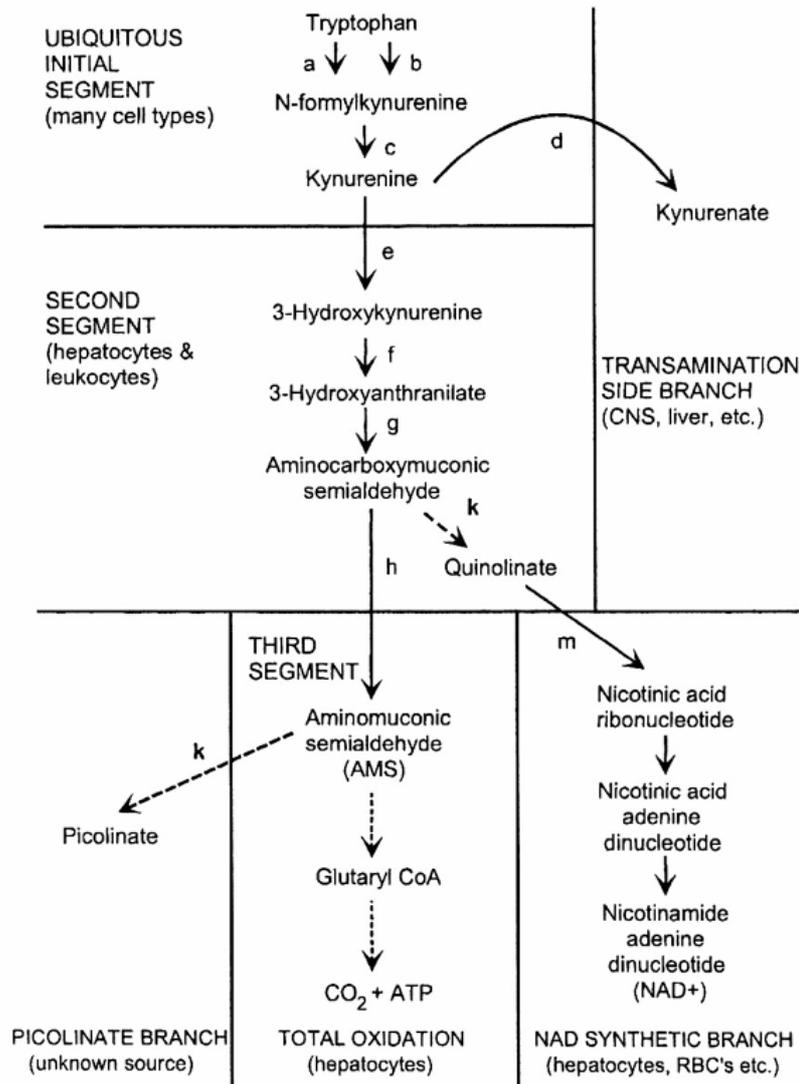


Abbildung 1.9: Vereinfachter schematischer Ablauf des Kynureninstoffwechsels.

Die Enzyme, die den Stoffwechsel katalysieren, sind als Buchstaben dargestellt. Die Bezeichnungen mit entsprechender EC Nummer (Enzyme Commission code) sind wie folgt angeführt: (a) Tryptophan-Dioxygenase (TDO), EC 1.13.11.11; (b) Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO), EC 1.13.11.17; (c) Kynurenin-Formamidase, EC 3.5.1.9; (d) Kynurenin Aminotransferase (KAT), EC 2.6.1.7; (e) Kynurenin 3-Monooxygenase, EC 1.14.13.9; (f) Kynureninase, EC 3.7.1.3; (g) 3-Hydroxyanthranilat Dioxygenase (HADO), EC 1.13.11.6; (h) α -Amino- α -Carboxymuconat- ϵ -Semialdehyd Decarboxylase (ACMSD), EC 4.1.1.45; (m) Quinolinat-Phosphoribosyltransferase (QPRT), EC 2.4.2.19; (k) Spontane nichtenzymatische Reaktionen (Moffett & Namboodiri, 2003).

1.6.1 IDO-Aktivität

Eine Vielzahl unterschiedlicher pathologischer Bedingungen wie Tumorregression (Ozaki *et al.*, 1988; Takikawa *et al.*, 1988), Abstoßung homologer Transplantate (Holmes *et al.*, 1992), zerebrale Ischemie (Saito *et al.*, 1993 a,b) sowie bakterielle-, parasitäre- und virale Infektionen (Thomas *et al.*, 1993) führen zu einer Induktion der IDO-Aktivität in einigen Geweben. Es gibt darüber hinaus auch eine durch IDO-vermittelte Immunsuppression, die eine gegen den Fetus als allogenes Transplantat gerichtete Abwehrreaktion verhindert (Munn *et al.*, 1998). Die IFN- γ -induzierte antibakterielle, -parasitäre und -virale Aktivität korreliert mit der Induktion von IDO (Habara-Ohkubo *et al.*, 1993; Gupta *et al.*, 1994). Diese anti-pathogene Wirkung des Enzyms IDO wird durch die Spaltung von L-Trp zu Kynurenin vermittelt. In Abwesenheit von L-Trp wird das Wachstum einiger Protozoen wie *Toxoplasma gondii* (Fujigaki *et al.*, 2002) oder einiger Bakterien wie Streptokokken gehemmt.

Außerdem konnte bewiesen werden, dass IDO die IFN- γ -Aktivität gegen Viren wie CMV (Bodaghi *et al.*, 1999), HSV-1 (Adams *et al.*, 2004 a) und HSV-2 (Adams *et al.*, 2004 b) vermittelt. Bei diesen Infektionen konnte die Spezifität der IDO-Aktivität durch Zugabe von L-Tryptophan, das den antiviralen IFN- γ -Effekt aufhebt, gezeigt werden.

1.7 Ziele der Arbeit

Die Ziele der Arbeit bestehen darin,

- 1.) die Infizierbarkeit von Endothelzellen mit Masernviren zu charakterisieren und
- 2.) antiviral wirksame Mechanismen in Endothelzellen zu analysieren.

Vakzine- und Wildtypstämme von Masernviren weisen eine differentielle Benutzung der MV-Rezeptoren auf. Basierend auf der Beobachtung, dass sich MV-RNA in den EZ von SSPE-Gehirnen findet (Cosby & Brankin, 1995), soll festgestellt werden, ob humane Endothelzellen die MV-Rezeptoren CD46 und CD150 auf ihrer Zelloberfläche exprimieren.

Der antivirale Effekt von Interferonen spielt bei der MV-Vermehrung eine entscheidende Rolle. Basierend auf den Ergebnissen, dass das Typ II-Interferon in EZ eine intrazelluläre Aktivität gegen Masernviren induziert, soll in dieser Arbeit die antivirale Aktivität von IFN- γ gegen MV untersucht werden.

2 Material

2.1 Zellen

ZELLINIE	ZELLTYP	HERKUNFT	LITERATUR
A549	Lungenkarzinom, Epithel-Zelllinie	Mensch	<i>Giard et al., 1973</i>
ARPE19	Netzhautpigment Epithel-Zelllinie	Mensch	<i>Rakoczy et al., 1998</i>
B95a	B-Zelllinie, EBV-transformiert	Krallenaaffe (<i>Callithrix jachus</i>)	<i>Miller & Lipman, 1973</i>
BJAB	B-Zelllinie, EBV-transformiert	Mensch	<i>Menezes et al., 1975</i>
CHO-K1	Ovar, Epithel-Zelllinie	chin. Hamster	<i>Puck et al., 1958</i>
CHO 5.3	Ovar, Epithel-Zelllinie	chin. Hamster	<i>Loveland et al., 1993</i>
CHO SLAM	Ovar, Epithel-Zelllinie	chin. Hamster	<i>Erlenhöfer et al., 2001</i>
HBMEC	Mikrovaskuläre Gehirn-Endothelzelllinie	Mensch	<i>Stins et al., 1997</i>
HeLa	Zervixkarzinom, Epithel-Zelllinie	Mensch	<i>Scherer et al., 1953</i>
HUVEC	Nabelschnurvene, Endothelzellen	Mensch	<i>Marin et al., 2001</i>
IMR-32	Neuroblastoma-Zelllinie	Mensch	<i>Tumilowicz et al., 1967</i>
Jurkat	Akute T-Zell-Leukämie T-Zelllinie	Mensch	<i>Schneider et al., 1977</i>
NT2	Teratokarzinom-Zelllinie	Mensch	<i>Andrews et al., 1984</i>
SK-N-MC	Neuroblastoma- Zelllinie	Mensch	<i>Spengler et al., 1973</i>

ZELLINIE	ZELLTYP	HERKUNFT	LITERATUR
THP-1	Akute Monoz.-Leukämie Monozyten-Zelllinie	Mensch	<i>Tsuchiya et al., 1980, 1982</i>
Vero	Niere, Fibroblasten-Zelllinie	Grüne Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	<i>Yasumura et al., 1963</i>
86HG39	Glioblastoma-Zellen	Mensch	<i>Bilzer et al., 1991</i>

Die meisten Zelllinien können bei der American Type Culture Collection (ATCC) [<http://www.lgcpromochem.com/atcc/>] oder bei der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) [<http://www.dsmz.de/>] bezogen werden. Der vorwiegende Anteil an Zelllinien sind am Institut für Virologie und Immunbiologie in Würzburg verfügbar.

2.2 Viren

Virus Kurzbezeichnung	Virus Stamm	Zelllinie (für Passagierung)	Herkunft
Edm	Edmonston B/Vaccine 60's	Vero	Prof. ter Meulen
EdmGFP	(rekombinant)	Vero	<i>Duprex et al., 1999</i>
Wü-4797	Würzburg.DEU/1996/4797	BJAB	Virusdiagnostik, Würzburg
Wü-5679	Würzburg.DEU/1997/5679	BJAB	
WTFb	Erlangen.DEU/1990	BJAB	Erlangen
HSV-1	Prototypstamm "Kupka"	Vero	Prof. P. Wutzler, Jena

Tabelle 2.1: Verwendete Masern- und Herpesvirusstämme.

Die Tabelle zeigt Vakzin (Edmonston)-MV und Wildtyp (Wü-4797, Wü-5679, WTFb)-Masernvirusstämme sowie die Herkunft und das Jahr der Isolation. Die MV-Würzburg-Isolate wurden in der Abteilung für Diagnostik des Instituts für Virologie und Immunbiologie in Würzburg aus klinischen Masernfällen isoliert. Zudem ist die entsprechende Zelllinie angegeben, die zur Passagierung der einzelnen Viren verwendet wurde.

2.3 Antikörper

2.3.1 Primärantikörper

Antikörper	Spezifität	Herkunft/Typ	Hersteller
F227	MV-N	Maus/mAk	S. Löffler
K4	MV-H	Maus/mAk	S. Löffler
ICP0, IE110	HSV-1 ICP0	Maus/mAk	Virusys (Kat.-Nr. H1A027-100)
5C6	CD150	Maus/mAk	S. Löffler
13/42	CD46 SCR-1	Maus/mAk	S. Löffler
IDO	Mensch/Maus	Maus/mAk	CHEMICON (Kat.-Nr. MAB412)
MxA143	Mensch Mx-A	Maus/mAk	S. Schneider-Schaulies
STAT1	Mensch/Maus	Maus/mAk	BD Biosciences (Kat.-Nr. 610185)
STAT1(pY701)	Mensch/Maus	Maus/mAk	BD Biosciences (Kat.-Nr. 612132)
Aktin	Aktin	Kaninchen	SIGMA (Kat.-Nr. A2066)

2.3.2 Sekundärantikörper

Peroxidase-conjugated goat anti-mouse	DIANOVA (Kat.-Nr. 115-035-003)
Peroxidase-conjugated goat anti-rabbit	DIANOVA (Kat.-Nr. 111-035-045)
HRP-conjugated swine anti-rabbit	Dako (Kat.-Nr. P0217)
AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG	Molecular Probes (Kat.-Nr. A-11001)

2.4 Medien, Lösungen und Puffer

2.4.1 Zellkultur

FKS	Biochrom AG (Kat.-Nr. S0115)
Gelatine	SIGMA (Kat.-Nr. G-2500)
Hanks ⁻ salt solution (ohne Phenolrot)	Biochrom AG (Kat.-Nr. L2045)
Neutralrot	SIGMA (Kat.-Nr. N-2889)
Trypanblau-Lösung (0,4 %)	SIGMA (Kat.-Nr. T8154)
Agar (2 %)	2 g Bacto-Agar in 100 ml A.dest. (autoklavieren)
ATV-Lösung	137 mM NaCl, 5 mM KCl, 5 mM D(+)-Glucose, 7 mM NaHCO ₃ , Trypsin (0,5g/L), Versene (0,2g/L)
doppel MEM (2 x)	doppelte Menge an MEM Bestandteilen pro Liter
Einfriermedium	FKS mit 10 % DMSO
FACS-Puffer	0,4 % BSA, 0,02 % N ₃ in Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem PBS
L(+)-Glutamin	342 mM (5 g/100 ml A.dest.)
Medium 199	GIBCO Invitrogen (Kat.-Nr. 22340-020)
MEM	Minimal essential medium (Eagle & Levine, 1967)
Mowiol	2,4 Mowiol® 4-88 (Calbiochem, Kat.-Nr. 475904), 6 g Glycerin, 2,42 g Tris, 0,45 g DABCO (SIGMA, Kat.-Nr. D-2522)
Natriumhydrogencarbonat (5,6 %)	666 mM (56 g/L NaHCO ₃ in A. dest.)
Neutralrotlösung	16 g/L in A. dest.
Overlay-Agar	25 % MEM (5 % FKS), 37,5 % Agar (2 %), 37,5 % doppel MEM
Paraformaldehyd	3,7 % Paraformaldehyd in Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem PBS
PBS (pH 7,4)	138 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ , 1,5 mM KH ₂ PO ₄ , 0,9 mM CaCl ₂ , 0,5 mM MgCl ₂

PBS ⁻	PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺
RPMI 1640	GIBCO Invitrogen (Kat.-Nr. 51800-043)

2.4.1.1 Spezielles Medium (HBMECs)

380 ml	RPMI 1640	GIBCO (Kat.-Nr. 72400-021)
50 ml	FKS (10 %)	Biochrom AG (Kat.-Nr. 0115)
50 ml	Nu-Serum TM IV (10 %)	FALCON (Kat.-Nr. 355504)
5 ml	MEM non-essential amino acids (100x)	SIGMA (Kat.-Nr. M7145)
5 ml	MEM vitamins solution (100 x)	SIGMA (Kat.-Nr. M6895)
5 ml	Natriumpyruvat (100 mM)	SIGMA (Kat.-Nr. S-8636)
1 ml	Heparin (5 U/ml)	SIGMA (Kat.-Nr. H3393)
4 ml	ECGS (30 µg/ml)	SIGMA (Kat.-Nr. E-2759)
	Penicillin/Streptomycin (je 1g/10 ml)	

2.4.1.2 Spezielles Medium (HUVECs)

395 ml	M199	GIBCO (Kat.-Nr. 22340-020)
100 ml	FKS (10 %)	Biochrom AG (Kat.-Nr. 0115)
1 ml	Heparin (5 U/ml)	SIGMA (Kat.-Nr. H3393)
4 ml	ECGS (30 µg/ml)	SIGMA (Kat.-Nr. E-2759)
	Penicillin/Streptomycin (je 1g/10 ml)	

2.4.2 Bakterienkultur

LB-Medium

10 g/L	Bacto-Trypton	Boehringer
5 g/L	Hefe-Extract	Difco
10 g/L	NaCl	AppliChem
20 g/L	Agar	Difco

TjbI	30 mM KAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ -2H ₂ O, 150 mM MnCl ₂ -4H ₂ O, 75 ml Glyzerin auf 500 ml (pH 5,8)
TjbII	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ -2H ₂ O, 10 mM RbCl, 15 ml Glyzerin auf 100ml (pH 6,5)

2.4.3 Molekularbiologie

0,1 M DTT	GIBCO Invitrogen
5x First Strand Puffer	GIBCO Invitrogen
Nucleotid-Mix (dNTP)	Fermentas Life sciences
oligo(dT) ₁₅ -Primer	Roche, Promega
10x Taq-Puffer	Fermentas Life sciences, Promega
DNA-Puffer	50 mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM EDTA, 100 mM NaCl, 1 % SDS
Farbpuffer (DNA)	50 % Glyzerin, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylencyanol
10x DNase I-Puffer	400 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 60 mM MgCl ₂
TAE-Gelelektrophoresepuffer	2 M Tris-base, 0,57 % Eisessig, 0,6 M EDTA

2.4.4 Proteinbiochemie

Bicinchoninic Acid solution	SIGMA (Kat.-Nr. B-9643)
Copper (II) sulfate solution (4 %)	SIGMA (Kat.-Nr. C-2284)
Entwicklerlösung für Röntgenfilme	Kodak
Fixierlösung für Röntgenfilme	Kodak
Magermilchpulver Instant	Saliter
Protein G Sepharose	Pharmacia Biotech (Kat. Nr. 17-0618-01)

Protein-Größenmarker	Fermentas (Kat.-Nr. SM0671)
Blocking-Puffer	TBST-Lösung, 5 % Magermilchpulver (Saliter)
Elutionspuffer (Ak-Säule)	0,1 M Glycin-HCl (pH 2,7)
Neutralisationspuffer	3 M Potassiumacetat (pH 5,5)
NP-40 Lysepuffer	1 % NP-40, 125 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM EDTA (pH 7,4), 1 Tablette Proteaseinhibitor
PBS-T	0,05 % Tween 20 in PBS (pH 7,4)
Proteaseinhibitor	1 Tablette pro 50 ml Lysepuffer, Roche Diagnostics (Kat.-Nr. 1873580)
Proteinstandard	1 mg/ml BSA in 0,15 M NaCl SIGMA (Kat.-Nr. P-0914)
SDS-Elektrophoresepuffer	3,03 % Tris, 14,4 % Glycin, 1 % SDS
SDS-Lämmli-Probenpuffer	7 ml 4x TrisHCl (0,5 M Tris, 0,4 % SDS, pH 6,8), 1 g SDS, 3 ml Glyzerin, 1,2 mg Bromphenolblau, auf 10 ml A. dest. auffüllen
TBS	25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl (pH 7,4)
TBST	TBS + 0,05 % Tween 20
Waschpuffer (Ak-Säule)	20 mM NaH ₂ PO ₄ , 20 mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4)
Western Blot I-Puffer	0,3 M Tris-HCl (pH 10,4), 20 % Methanol
Western Blot II-Puffer	0,025 M Tris-HCl (pH 7,4), 20 % Methanol
Western Blot III-Puffer	0,04 M Aminocaprinsäure (Hexansäure), 0,025 M Tris-HCl (pH 9,4), 20 % Methanol

2.5 Oligonukleotide (Primer)

PRIMER BEZEICHNUNG	SEQUENZEN 5' → 3'	SPEZIFITÄT
β-Aktin fw	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC C	human β-Aktin
β-Aktin rev	CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT	human β-Aktin
CD46 fw	TCG ATA CAT ATG GAG CCT CCC G	human CD46
CD46 rev	CTA GGC CTA CTT ACA AGC CTC C	human CD46
GAPDH fw	ATG GGG AAG GTG AAG GTC GGA GTC	human GAPDH
GAPDH rev	CAG CGT CAA AGG TGG AGG AGT GG	human GAPDH
IDO fw	GCA AAT GCA AGA ACG GGA CAC T	human IDO
IDO rev	TCA GGG AGA CCA GAG CTT TCA CAC	human IDO
Morbilli fw	ATG TTT ATG ATC ACA GCG GT	universale P-Primer
Morbilli rev	ATT GGG TTG CAC CAC TTG TC	Morbilliviren
iNOS fw	TCC AAC CTG CAG GTC TTC GAT GC	human iNOS
iNOS rev	GGA CCA GCC AAA TCC AGT CTG C	human iNOS
SLAM fw	CTC CTC ATT GGC TGA TGG ATC C	SLAM (CD150)
SLAM rev	TTT ATG AGC AGG TCT CCA CTC C	SLAM (CD150)

2.6 Zytokine

Inteferon- α ($\geq 1 \times 10^9$ Units/mg)	Strathmann Biotech AG (Kat.-Nr. 9515160)
Interferon- γ ($\geq 2 \times 10^7$ Units/mg)	Tebu-bio (Kat.-Nr. 300-02)
Interleukin-1 β ($1,3 \times 10^8$ Units/mg)	Strathmann Biotec AG (Kat.-Nr. 9515173)
Tumor Nekrose Faktor- α (1×10^8 Units/mg)	Strathmann Biotec AG (Kat.-Nr.9511500)

2.7 Kits

ABI Sequencing ECL™	Perkin-Elmer (Kat.-Nr. 4303152)
GenElute Mammalian total RNA Kit	Amersham (Kat.-Nr. RPN 2106)
Mycoplasmen PCR Detektion Kit	SIGMA (Kat.-Nr. RTN-70)
Ready-To-Go PCR beads	Minerva biolabs (Kat.-Nr. VGM-100)
Rneasy Mini Kit	Amersham (Kat.-Nr. 27-9558-01)
Mouse Mab isotyping test	Qiagen (Kat.-Nr. 74104)
QIAprep® Spin Miniprep Kit	HyCult biotech (Kat.-Nr. L2020)
QuikChange® II site-directed Mutagenese	Qiagen (Kat.-Nr. 27104)
	Stratagene (Kat.-Nr. 200523)

2.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase	Fermentas Life sciences (Kat.-Nr. EF0511)
Restriktionsendonukleasen	Fermentas Life sciences
DNase I (RNase-frei)	Roche (Kat.-Nr. 776785)
Proteinase K	SIGMA (Kat.-Nr. P6556)
SuperScriptIII RNase H RTranskriptase	GIBCO Invitrogen (Kat.-Nr. 18064-022)
Taq DNA-Polymerase	Fermentas Life sciences (Kat.-Nr. EP0282)
T4 Ligase	Fermentas Life sciences (Kat.-Nr. EL0014)

2.9 Chemikalien

Acrylamid 4K-Lösung (30 %)	AppliChem
Agarose (Elektrophorese Grad)	Invitrogen (Kat.-Nr. 15510-027)
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumpersulfat (Elektrophorese)	SIGMA (Kat.-Nr. A3678)
Ammoniumsulfat	Merck

BSA (Fraktion V)	ICN (Kat.-Nr. 160069)
Chloroform	AppliChem
4'-6-Diamidino-2-phenylindole	Molecular Probes (Kat.-Nr. D1306)
1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane	SIGMA (Kat.-Nr. D-2522)
4-(Dimethylamino)benzaldehyd	SIGMA (Kat.-Nr. D2004)
Dimethylsulfoxid	Roth
EDTA	SIGMA
Eisessig	Baker
Ethanol (absolut)	AppliChem
Ethidiumbromid	SIGMA
Formaldehyd (37 %)	Roth
Glycin	AppliChem
Größenstandards	
DNA-Leiter	Fermentas Life sciences
SDS-PAGE Protein-Größenmarker	Fermentas Life sciences
HEPES	SIGMA
Isoamylalkohol	AppliChem
Isopropylalkohol	AppliChem
L-Kynurenin Sulfat Salz	SIGMA (Kat.-Nr. K3750)
Magnesiumchlorid	SIGMA
β -Mercaptoethanol	SIGMA
Methanol	Merck
Mineralöl	SIGMA
Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumdodecylsulfat	SIGMA
Natriumhydroxid	Merck
Neutralrot (pH 6,8-8,0)	SIGMA
NP-40 Alternative	Calbiochem (Kat.-Nr. 492016)
Paraformaldehyd	Merck
Polyethylenglycol 6000	Merck
peqGOLD RNA Pure	pegLab

Protein G Sepharose	Pharmacia
Salzsäure 32 %	Baker
Sukrose	SIGMA
TEMED	SIGMA
Trichloressigsäure	Merck (Kat.-Nr. 1.00810.0250)
Tris-Base	Roth
Triton X-100	SIGMA
L-Tryptophan	Merck (Kat.-Nr. 1.08396.0100)
Tween 20	SIGMA (Kat.-Nr. P-1379)

2.10 Verbrauchsmaterialien

Steriles Einwegmaterial für die Zellkultur (Gewebekulturflaschen, Platten), für die Molekularbiologie (Reaktionsgefäße) und für die allgemeine Laborarbeit wurde von den Firmen Eppendorf, Greiner, Nalge Nunc und Sarstedt geliefert.

Dialyseschläuche	Serva
Einmalhandschuhe	Kimberly-Clark, Roth
Einmalkanülen	Dispomed
Einmalküvetten	Eppendorf
Kammerobjektträger	LabTek
Nitrozellulosemembran	Schleicher & Schuell
Parafilm	Roth
Pasteurpipetten	Nalge Nunc
Pipettenspitzen	Eppendorf, Roth
Rollflasche für Gewebekultur	BD Biosciences
Röntgenfilme	Fuji Photo Film
Spritzen	Primo, BD Biosciences
Sterilfilter	Millipore
Whatmanpapier 3MM	BioRad
Zentrifugenröhrchen	Kontron

2.11 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer	Institutswerkstatt
Analysewaage	Sartorius
Autoklav	MM, München
Bakterienschüttler	Certomat, Braun
Binokular	Olympus
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschränke	Heraeus
Durchflußzytometer (FACScan)	Becton-Dickinson
Fluoreszenzmikroskop mit Digitalkamera	Aristoplan, Leitz
Glasplatten, Spacer, Kämmen	BioRad, Institutswerkstatt
Hämozytometer (Zählkammer)	Neubauer
Halbtrockenblottingapparatur	Institutswerkstatt
Heizblock	Eppendorf
Kühl- und Gefrierschrank	Siemens
Kryo-Einfrierbox Qualifreeze	QUALILAB®
Lab-Tek II Chamber Slide	Nalge Nunc
Mikropipetten	Eppendorf, Socorex
Mikroskop	Labowert FS, Leitz
Mikrowellengerät	Panasonic
Netzgeräte	Consort
PCR-Maschinen	Perkin Elmer, Eppendorf
pH-Meter	HANNA instruments
Rotoren JA10, JA20	Beckmann
SDS-Gelelektrophoresekammer	Institutswerkstatt
Sterilwerkbank	Gelaire
Tiefkühltruhe (-80 °C)	REVCO
Tischzentrifugen	Heraeus, Eppendorf
Ultrazentrifugen	Sorvall, DuPont Industries
Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer)	Beckman

Vortexer

Bender & Hobein

Waage

Bosch

Wasserbad

Köttermann

Zentrifugen

Hettich

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Passagieren von Zellen

Die Zellen werden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² bis zur Konfluenz routinemäßig gezüchtet. Beim Passagieren wird das Nährmedium abgesaugt, die Zellen einmal mit einer 37 °C warmen ATV-Lösung gewaschen und mit 1 ml ATV-Lösung im Brutschrank bei 37 °C solange inkubiert, bis sich die Zellen ablösen. Danach werden die Zellen in 5 bis 10 ml Medium aufgenommen, 5 Minuten mit 1.200 rpm bei RT zentrifugiert und im Medium resuspendiert. Je nach Art der Zelllinie werden die Zellen entsprechend in 10 bis 15 ml Medium aufgenommen und in den benötigten Kulturflaschen ausgesät.

3.1.2 Zellkultur adhärenter Zellen

Adhärenente Zellen (Standardzelllinien wie HeLa- oder Vero-Zellen) werden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² ausgesät und mit NaHCO₃-gepufferten MEM mit 5 % FKS, Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin) und 200 mM L-Glutamin im 37 °C-Brutschrank unter 5 % CO₂-Begasung liegend kultiviert. Nach Erreichen konfluenter Monolayer werden die Zellen im Verhältnis 1:10 auf neue Flaschen verteilt. Zur Kultivierung von adhärenenten B95a-Zellen dient NaHCO₃-gepuffertes RPMI mit 10 % FKS, Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin) und 200 mM L-Glutamin als Nährmedium.

3.1.3 Zellkultur von Suspensionszellen

Suspensionszellen (Standardzelllinien wie BJAB-Zellen oder Jurkat-Zellen) werden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² verteilt und mit NaHCO₃-gepufferten RPMI mit 10 % FKS, Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin) und 200 mM L-Glutamin im 37 °C-Brutschrank unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert.

Dicht bewachsene Kulturflaschen werden im Verhältnis 1:5 auf neue Flaschen passagiert, indem die Suspensionszellen 5 Minuten bei 1.200 rpm zentrifugiert und das Zellpellet in ein entsprechend neues Medium aufgenommen wird.

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Die Zellen werden abgelöst, im entsprechenden Medium resuspendiert und für 10 Minuten mit 1.200 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet im kalten Einfriermedium (FKS mit 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zelldichte sollte etwa 10⁶ Zellen pro ml Medium entsprechen. Diese Zellsuspension wird auf vorgekühlte und vor allem beschriftete (Zelltyp, Passage, Datum und Besitzer) Kryoröhrchen verteilt und sofort in eine Qualifreeze Kryo-Einfrierbox (QUALILAB[®]) gegeben. Diese Kryo-Einfrierbox mit einer Abkühlrate von 1 °C pro Minute wird über Nacht auf –80 °C gekühlt. Am nächsten Tag werden die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff gelagert.

Beim Auftauen wird die gefrorene Zellsuspension rasch in einem geheizten Wasserbad (37 °C) aufgetaut und anschließend in einen zehnfachen Überschuss Medium überführt, um das DMSO zu verdünnen. Durch eine nachfolgende 10-minütige Zentrifugation bei 1.200 rpm und 4 °C wird das Zellpellet im 37 °C-Medium aufgenommen und in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² überführt. Die Zellen werden im 37 °C-Brutschrank \ddot{U} N kultiviert und am nächsten Tag wird das Medium durch frisches ersetzt, um tote Zellen im Überstand zu entfernen.

3.1.5 Mykoplasmentest

Um bei der Kultivierung der Zelllinien und der Primärzellkulturen eine Kontamination durch Mykoplasmen - dabei handelt es sich um zellwandlose, parasitäre Bakterien - zu vermeiden, sollte regelmäßig ein Mykoplasmentest durchgeführt werden. Dafür werden die zu prüfenden Zellkulturen in das entsprechende Kulturmedium ohne Antibiotikum überführt und für drei Tage kultiviert. Der Mykoplasmenachweis erfolgt mit einem Mykoplasmen PCR Detektion-Kit (VenorGeM[®], minerva biolabs). 100 µl des Zellkulturüberstandes wird als Probenmaterial verwendet. Dieser wird im Heizblock für 5 Minuten bei 95 °C gekocht und anschließend für eine Minute mit 13.000 rpm bei RT zentrifugiert. Vom Überstand werden 2 µl für den PCR-Test eingesetzt.

Die PCR-Reaktion wird wie folgt zusammenpipettiert:

5 µl 10x PCR-Puffer
5 µl Primer-Nucleotid MIX
2 µl interne Kontrolle
1 U Taq DNA-Polymerase
→ auf 48 µl A. dest. auffüllen

Das PCR-Programm wird wie folgt programmiert:

1. Zyklus

94 °C 2 Minuten

55 °C 2 Minuten

72 °C 2 Minuten

2.-34. Zyklus

94 °C 30 Sekunden

55 °C 1 Minute

72 °C 1 Minute

35. Zyklus

72 °C 4 Minuten

Mykoplasmen können von einer Zellkultur mit einer Antibiotika-Kombinationsbehandlung vollständig eliminiert werden, indem dem Kulturmedium zuerst BM-Cyclin1 (Pleuromutilin-Derivat, 10 µg/ml) für 3 Tage zugegeben und dann, nach Mediumwechsel, BM-Cyclin2 (Tetracyclin-Derivat, 5 µg/ml) für 4 Tage zugesetzt wird. Diese 7-tägige Behandlung wird dreimal wiederholt. Um eine erfolgreiche und dauerhafte Eliminierung überprüfen und überwachen zu können, sollten routinemäßig PCR-Mykoplasmentests durchgeführt werden.

3.1.6 Beschichten der Kulturflaschen mit Gelatine

Zur Kultivierung von EZ werden die Zellkulturflaschen mit einer 0,5%igen Gelatinelösung beschichtet. Dafür werden 2,5 g Gelatine in 500 ml A. dest. für 1 Stunde auf einem Heizrührer bei 80 bis 100 °C gelöst und dann nochmals für 1 Stunde bei 120 °C autoklaviert. Dann werden die Zellkulturflaschen mit der Gelatinelösung 1 bis 2 Stunden bei RT beschichtet. Mit einer Pasteurpipette wird die Gelatinelösung sorgfältig entfernt und die Zellkulturflaschen mit PBS mehrmals gewaschen. Die Zellkulturflaschen können bis zur Verwendung bei 4 °C gelagert werden.

3.1.7 Bestimmen der Gesamtzellzahl und deren Lebensfähigkeit

Eine Zellsuspension und eine 0,4%ige Trypanblaulösung werden im Verhältnis 1:1 gemischt, 5 Minuten bei RT inkubiert und 10 µl davon in ein Hämocytometer (Neubauer Zählkammer) pipettiert. Lebende Zellen bleiben ungefärbt. Tote oder geschädigte Zellen nehmen den Farbstoff auf und das Zytoplasma sowie der Kern erscheinen blau.

Zellzahl/ml = Durchschnittliche Zahl der Zellen pro Quadrat × Verdünnungsfaktor × 10^4

Gesamtzellzahl = Zellen/ml × Ausgangsvolumen der Suspension

Lebensfähigkeit der Zellen (%) = Anzahl lebender (ungefärbter) Zellen ÷ Summe aller (gefärbter & ungefärbter) Zellen × 100 %

3.1.8 Isolierung von HUVECs

Um mit primären humanen Endothelzellen (EZ) experimentieren zu können, müssen diese aus der Nabelschnurvene isoliert werden. Dazu sind die Nabelschnüre (Ns) in einem Transportbehälter mit Antibiotikumhaltigen (Penicillin/Streptomycin), sterilen PBS aus der Entbindungsstation der Universitätsklinik Würzburg geholt und innerhalb weniger Stunden präpariert worden. Eine Ns (ca. 30 cm Länge) wird kurz in ein Becherglas mit Ethanol eingetaucht und dann in ein Becherglas mit PBS gelegt. Die Enden der Ns werden hinter der abgebundenen Stelle abgeschnitten. Der Katheter der Venenverweilkanüle (BD BialonTM, Kat.-Nr. 393 209) wird vorsichtig in die Nabelschnurvene eingeschoben und mit einer Klammer fixiert. Mit sterilem PBS wird die Ns durchgespült, um das Nabelschnurblut zu entfernen. Mit einer 0,05%igen Kollagenase/PBS-Lösung (Collagenase A, Boehringer Mannheim, Kat.-Nr. 103 586) wird das restliche PBS ausgespült und die Ns am unteren Ende abgeklemmt. Die Ns wird dann mit der Kollagenase/PBS-Lösung prall gefüllt und am Katheter abgeklemmt. Dieser wird dann vorsichtig entfernt und die Ns in einem 37 °C-Wasserbadglas für 7 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Ns auf eine Glasplatte gelegt, mit Zellstoff grob abgetupft und mit den Fingern gut durchmassiert, damit sich die EZ besser lösen können. Unterhalb einer Klemme kann im Abstand von 1 bis 2 cm eine weitere Klemme angebracht werden und hinterher wird die Ns zwischen diesen beiden Klemmen mit einem Skalpell durchtrennt. Dann wird die letztangebrachte Klemme geöffnet und der Inhalt soll in ein 50 ml Röhrchen (GREINER) mit M199-Medium einlaufen. Die Zellsuspension wird für 10 Minuten mit 1.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird in 5 ml M199 mit 10 % FKS und Antibiotikum resuspendiert. Die Zellzahl wird bestimmt und anschließend werden ca. 10⁶ Zellen in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 25 cm² pipettiert. Diese Zellkulturflasche sollte zuvor mit einer 0,5%igen Gelatinelösung beschichtet werden (Siehe dazu Punkt 3.1.6). Diese EZ aus der Ns zählen als Passage Null und können wie unter Punkt 3.1.1 passagiert werden.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Virusvermehrung (attenuierte Masernvirusstämme)

Bei der Virusvermehrung von attenuierten Masernvirusstämmen (*seed virus*) werden adhärente Vero-Zellen verwendet.

Zur Vorinfektion wird eine 80 bis 90 % konfluente Zellkulturflasche (650-750 ml, 162-175 cm² Wachstumsfläche) mit MV mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,01 in serumfreien Medium infiziert. Nach einer Inkubation von einer Stunde bei 37 °C wird das Medium entfernt und die Zellen mit frischem Medium (5 % FKS) bei 33 °C oder auch 37 °C bis zum Erreichen des maximalen cytopathischen Effekts (CPE) nach etwa 3 bis 5 Tagen kultiviert. Um das MV isolieren zu können, wird das Medium bis auf einige ml entfernt und die Zellkulturflasche bei – 80 °C ÜN eingefroren. Am nächsten Tag werden die Zellen im 4 °C-Kühlraum aufgetaut und anschließend mit einem Zellschaber vom Zellkulturboden abgelöst. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren kann das zellgebundene Virus freigesetzt werden. Die Zellbruchstücke werden durch Zentrifugation für 15 Minuten mit 4.000 rpm bei 4 °C entfernt.

Der MV-haltige Überstand (Inokulum) wird auf zehn 80 bis 90 % konfluente Zellkulturflaschen (650-700 ml, 162-175 cm² Wachstumsfläche) verteilt und im 37 °C-Brutschrank für 1 Stunde inkubiert. Anschließend wird das Inokulum abgenommen und mit frischem Medium (5% FKS) ersetzt. Nach etwa 3 bis 5 Tagen wird das Medium bei starker Synzytienbildung soweit entfernt, dass der Boden der verwendeten Zellkulturflaschen gerade noch bedeckt ist und anschließend werden diese bei –80 °C ÜN eingefroren. Am nachfolgenden Tag werden die infizierten Zellen bei 4 °C aufgetaut und mit einem Zellschaber vom Zellkulturboden abgelöst. Durch mehrmaliges Auf- und Abpipettieren kann das zellgebundene Virus freigesetzt werden. Die Zellbruchstücke werden durch Zentrifugation für 15 Minuten mit 4.000 rpm bei 4 °C entfernt. Anschließend kann der Überstand als Virusstock in beschriftete (Virusstamm, Datum, Besitzer) Kryoröhrchen aliquotiert und bei –80 °C gelagert werden. Die Viruskonzentration wird dann durch einen Plaque-Test auf Vero-Zellen bestimmt (siehe Punkt 3.2.4).

3.2.2 Virusvermehrung (Wildtyp-Masernvirusstämme)

Bei der Virusvermehrung von Wildtyp-Masernvirusstämmen werden BJAB-Suspensionszellen verwendet.

10^7 BJAB-Zellen werden in einem 50 ml Röhrchen (GREINER) für 5 Minuten mit 1.200 rpm bei RT zentrifugiert. Das Zellpellet wird mit einem Inokulum mit einer MOI von 0,01 für eine Stunde bei 37 °C infiziert. Dann wird der Virus-Zell-Suspension 10 ml serumfreies Medium hinzugegeben und anschließend für 5 Minuten mit 1.200 rpm bei RT zentrifugiert. Das infizierte Zellpellet wird mit 50 ml Medium (10 % FKS) versetzt und in eine Zellkulturflasche mit einer Wachstumsfläche von 162-175 cm² transferiert. Anschließend wird die Zellkulturflasche auf ein Volumen von 100 ml mit serumfreiem Medium aufgefüllt und die Zellen bis zur maximalen Riesenzellbildung nach drei bis fünf Tagen bei 37 °C inkubiert. Dann werden die infizierten Zellen 10 Minuten mit 1.200 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der virushaltige Überstand wird sodann in eine Rollflasche für Gewebekultur (850 cm²) transferiert. Diese wird mit Medium (10 % FKS) auf Volumen von 300 bis 400 ml aufgefüllt. Zusätzlich werden noch 4×10^7 BJAB-Zellen hinzugegeben. Die Rollflasche wird im 37 °C-Brutraum auf einer Rollapparatur für 24 bis 48 Stunden kultiviert. Zur Ernte des Virus werden die infizierten Zellen für 10 Minuten bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Zellpellet wird in 10 ml serumfreiem Medium resuspendiert und bei -80 °C ÜN eingefroren. Am nächsten Tag werden die Zellen im Kühlraum bei 4 °C aufgetaut und das zellgebundene Virus durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren freigesetzt. Die Zellbruchstücke werden durch zwei Zentrifugationsschritte für 15 Minuten bei 4.000 rpm und 4 °C entfernt. Der virushaltige Überstand wird als Virusstock in beschriftete (Virusstamm, Datum, Besitzer) Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert. Die Viruskonzentration wird dann anhand einer Endpunkt-Titration auf B95a-Zellen bestimmt (siehe Punkt 3.2.6).

3.2.3 Ultrazentrifugation von MV-Präparationen

Zur Gewinnung von MV-Vorräten mit relativ hohen Virustitern werden die MV-Präparationen ultrazentrifugiert. Nach der Ausbildung starker Synzytien werden die infizierten Zellen in einem geringen Volumen bei -80 °C ÜN eingefroren und am nächsten Tag bei 4 °C aufgetaut. Zur Freisetzung des zellgebundenen MV wird das aufgetaute Virus-Zell-Material in einen sterilen Zellhomogenisator - in der Sterilbank auf Eis - überführt und mit 5 bis 10 Schüben homogenisiert, so dass das MV durch die Scherkräfte mechanisch freigesetzt wird. Durch zwei anschließende Zentrifugationen für 15 Minuten bei 4000 rpm und 4 °C werden die Zellbruchstücke pelletiert. Der virushaltige Überstand wird auf 25%ige Sukrosekissen (in PBS) in Ultrazentrifugenröhrchen (Polyallomer Centrifuge Tubes, Beckman) geschichtet. Die MV werden mittels UZ für 90 Minuten bei 26.000 rpm und 4 °C pelletiert. Das leicht durchsichtige Viruspellet wird mit einer sterilen Spritze (Einmal-Kanüle, 20G×1 1/2“, 0,9×40), die mit 200 bis 500 µl eiskalten PBS gefüllt ist, gelockert. Die gelösten Viruspellets werden vereinigt, anschließend auf vorgekühlte und beschriftete Kryoröhrchen verteilt und bei -80 °C gelagert. Alle Schritte sollten auf Eis durchgeführt werden, um einen möglichst hohen infektiösen Virustiter zu erhalten.

3.2.4 Plaque-Test

Um den Virustiter als “*plaque forming units*“ (pfu/ml) einer Viruspräparation von MV bestimmen zu können, wird ein Plaque-Test durchgeführt. Dazu werden entweder Vero-Zellen für attenuierte MV-Laborstämme oder Vero-SLAM-Zellen für Wildtyp-masernviren auf 6-Well-Zellkulturplatten ausgesät. Die zu titrierende Virus-Stammlösung wird in 1:10 Verdünnungsreihen mit Medium ohne FKS angesetzt und je 1 ml davon auf 80 % konfluente Zellen pipettiert. Das Medium wird nach einer einstündigen Inkubation bei 37 °C abgezogen. Anschließend wird der Zellrasen mit einem vorgewärmten (37 °C) Überschichtungsmedium (0,75%iger Agar in 2x MEM und MEM mit 5 % FKS) vorsichtig überschichtet. Die Zellen werden bis zum Erscheinen von Synzytien bei 37 °C inkubiert. Dann wird jedes einzelne Well mit 1 ml

0,01%igen Neutralrotlösung bedeckt und für eine Stunde bei RT inkubiert. Die Neutralrotlösung wird dann vorsichtig abgeschüttet und die Zellkulturplatten für 24 bis 48 Stunden im 37 °C-Brutschrank inkubiert. Abschließend werden die weiß erscheinenden Plaques ausgezählt, wobei infizierte (tote) Zellen ungefärbt bleiben und lebende Zellen den roten Farbstoff annehmen. Die Plaque-Zahl im letzten noch Plaque enthaltenden Well gibt den reziproken Wert der infektiösen Viruspartikel in 1 ml der eingesetzten Stammlösung wieder.

3.2.5 Virus-Klonierung

Um aus einer Virus-Stammlösung ein reines infektiöses Virusisolat zu erhalten, wird eine Plaque-Reinigung durchgeführt. Die zu reinigende Virus-Stammlösung wird in 1:10 Verdünnungsreihen in einer 6-Well-Zellkulturplatte mit semikonfluenten Vero-Zellen ausgesät. Das Medium wird nach einer Stunde bei 37 °C abgezogen und der Zellrasen mit dem Überbeschichtungsmedium, 0,75%iger Agar in 2x MEM und MEM mit 5 % FKS, überdeckt. Die Zellen werden bis zum Erscheinen von Synzytien bei 37 °C inkubiert. Große Einzelplaques werden mit einer Pasteurpipette vorsichtig ausgestochen. Diese virushaltigen Agarstücke werden direkt in das Medium einer Zellkulturflasche (25 cm² Wachstumsfläche) mit 80 % konfluenten Vero-Zellen überführt. Die Zellkulturflasche wird solange inkubiert bis ein vollständiger CPE sichtbar ist. Anschließend werden die Zellen durch Einfrieren bei -80 °C und nachfolgendes Auftauen lysiert. Der virushaltige Überstand wird für 15 Minuten bei 4.000 rpm, 4 °C zentrifugiert, um Zellbruchstücke zu pelletieren. Dieser kann dann in sterile, vorgekühlte und beschriftete Kryoröhrchen aliquotiert werden.

3.2.6 Virustiter-Bestimmung durch Endpunkt-Titration

Der Virustiter von Wildtyp-MV-Stämmen wird auf den adhärennten B95a-Zellen bestimmt. Für eine Endpunkt-Titration werden B95a-Zellen und die Virus-Stammlösung in 1:4 Verdünnungsreihen in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Diese wird dann für 5 Tage bei 37 °C inkubiert. Es wird der letzte Napf ausgewertet, in dem das

Virus noch eine deutliche Infektion zeigt. Aus jeweils 3 Ansätzen wird der Mittelwert bestimmt.

3.2.7 TCID₅₀ Test (50 % - Endpunkt-Titration)

Zur Bestimmung der TCID₅₀/ml werden 10⁵ B95a-Zellen pro 100 µl RPMI (10 % FKS) in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Das Medium wird nach einer Inkubation ÜN abgenommen. Es wird eine Verdünnungsreihe von 10⁻¹ bis 10⁻¹⁰ in RPMI ohne FKS durchgeführt, indem 900 µl Medium vorgelegt und jeweils 100 µl der Viruslösung überführt werden. Pro Verdünnungsstufe werden acht Näpfe der Zellkulturplatte mit je 100 µl versetzt. Die infizierten Zellen werden bis zum Erscheinen von Synzytien bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl der CPE-positiven Näpfe wird anhand eines Lichtmikroskopes nach 5 Tagen bestimmt. Die TCID₅₀/ml und der Standardfehler wird entsprechend den Formeln nach Spearman und Kärber berechnet.

$$\log TCID_{50} = \chi_{p=1} + \frac{1}{2}d - d \sum p$$

Abbildung 3.1: Formel zur Berechnung der 50%igen Endpunkt-Titration nach Spearman und Kärber.

In der Formel steht $\chi_{p=1}$ für den dekadischen Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch ein CPE in allen Näpfen der Verdünnung zu finden ist. d steht für den dekadischen Logarithmus des Verdünnungsfaktors. p entspricht dem Anteil an CPE-positiven Näpfen pro Verdünnungsstufe. Summe p ist die Summe aller p ab der Verdünnungsstufe $\chi_{p=1}$ und den p -Werten aller höheren Verdünnungen mit vorhandenem CPE. Es wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe berechnet, bei der 50 % der Zellen oder Näpfe einen CPE aufweisen.

3.3 Histochemische Methoden

3.3.1 Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie (FACS)

Für die Analyse in der Durchflusszytometrie (*"fluorescence-activated cell scanner"*, FACS) werden die Zellen durch Inkubation mit HBSS⁻-Medium und 1 mM EDTA von der Oberfläche der Zellkulturflaschen abgelöst, sorgfältig resuspendiert und gezählt. Pro Ansatz werden 1 bis 2×10^5 Zellen in ein 5 ml-FACS-Röhrchen pipettiert. Alle Zentrifugationsschritte werden für 10 Minuten mit 1.200 rpm und 4 °C in einer Hettich-Zentrifuge vollzogen. Als "FACS"-Puffer (FP) für die Waschschrte bzw. zur Verdünnung der Antikörper wird PBS⁻ mit 0,4 % BSA und 0,02 % Na-Azid (pH 7,4) verwendet. Die Zellen werden mit den Primärantikörpern und anschließend mit markierten Sekundärantikörpern in einem Volumen von 50 bis 100 µl für 30 bis 60 Minuten bei 4 °C inkubiert. Die sekundären Antikörper sollten im Dunkeln inkubiert werden, um ein Ausbleichen des Fluoreszenzfarbstoffes zu verhindern.

Bei den Lebendfärbungen mit Antikörper gegen Oberflächenantigene werden die Zellen ohne Fixierung mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert und anschließend zweimal mit je 1 ml FP gewaschen.

Bei intrazellulären Färbungen erfolgt eine Gesamtfärbung mit Fixieren und Permeabilisieren. Dazu werden die Zellen zuerst mit 200 µl 3,7 % Formaldehyd in PBS pro FACS-Röhrchen kurz gevortext und für 10 Minuten auf Eis fixiert. Anschließend werden die Zellen mit 100 µl 0,25 % Triton X100 in PBS pro FACS-Röhrchen kurz gevortext und für 10 Minuten auf Eis permeabilisiert. Dann folgt der Blockierungsschritt. Dabei werden unspezifische Bindungsstellen mit 1 ml Medium mit 10 % FKS für 30 Minuten auf Eis oder im 4°C-Kühlschrank ÜN inkubiert. Bei der intrazellulären Färbung ist es wichtig anzumerken, dass die Primärantikörper in PBS mit 0,25 % Triton X100 verdünnt werden.

Nach zwei abschließenden Waschschrten werden die Zellen in 100 µl FP resuspendiert und mittels Durchflusszytometrie analysiert. Für die quantitative Analyse wird ein *"Fluorescence-Activated Cell Sorter/Scanner"* (FACS) mit Argonlaser (488 nm) und

angeschlossenem Hewlett-Packard Computer mit LysisII-Software verwendet. Bei diesem Gerät ist es mit Hilfe des Laserlichtes möglich, Zellen anhand morphologischer Kriterien wie Größe (im "*forward scatter*", FSC) und Granularität (im "*side-scatter*", SSC) sowie exprimierter Antigene (nach Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen) zu unterscheiden und mit Hilfe der Computer-Software zu analysieren.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbung im Lab-Tek[®] II Chamber Slide

Ca. 5×10^4 adhärenente Zellen werden pro Kammer eines Lab-Tek II Chamber Slides (8 Well) ausgesät. Die Zellen werden ca. 12 Stunden bei 37 °C inkubiert, um eine ausreichende Zellanhaftung zu gewährleisten. Danach können die Zellen infiziert werden.

Bei einer Immunfluoreszenzfärbung von EZ werden die Lab-Tek II Chamber Slides vorher mit einer 0,5%igen Gelatinelösung beschichtet oder es werden speziell vom Hersteller beschichtete Lab-Tek II Chamber Slides (Nalge Nunc, Kat.-Nr. 154941) verwendet.

Um eine Immunfluoreszenzfärbung durchführen zu können, wird das Nährmedium vorsichtig abgekippt und die Zellen mit 200 µl 3,7 % p-Formaldehyd (PFA) für 7 bis 10 Minuten auf Eis fixiert. Wird eine intrazelluläre Färbung durchgeführt, müssen die Zellen anschließend noch mit 200 µl Permeabilisationspuffer (PBS mit 0,25 % Triton X100) für 10 Minuten auf Eis behandelt werden. Nach dem Waschschrift mit 500 µl/Well eiskaltem PBS sollten die Zellen mit Nährmedium (10 % FKS) für mindestens 45 Minuten auf Eis inkubiert werden, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem Waschen wird der 1. Antikörper in entsprechender Verdünnung in PBS zugegeben und eine Stunde auf Eis inkubiert. Nach zweifachem Waschen wird dann der Sekundärantikörper (Alexa Fluor[®] 488 Ziege anti-Maus IgG (H+L); 1:400 in PBS) im 4 °C-Kühlschrank für eine Stunde inkubiert. Nach dem Waschen kann zusätzlich noch eine Kernfärbung mit 200 µl DAPI (1:300 in PBS) im 4 °C-Kühlschrank für 4 Minuten durchgeführt werden. Nach zwei anschließenden Waschschriften wird der Waschpuffer sorgfältig abgesaugt. Das Lab-Tek II Chamber Slide wird dann kurz an der Luft getrocknet, der Kammeraufsatz entfernt und die Zellen zusammen mit wenigen Tropfen

Einbettungsmittel (MOWIOL[®] 4-88) mit einem Deckglas vorsichtig abgedeckt. Um ein Austrocknen der gefärbten Zellen zu verhindern, kann das Deckglas mit Nagellack fixiert werden. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop.

3.3.3 Herstellung von MOWIOL[®] 4-88

In einem Erlenmeyerkolben werden zu 2,4 g MOWIOL[®] 4-88 (Calbiochem, Kat.-Nr. 475904) 6 g (4,9 ml) Glycerin und 6 ml A. dest. unter Rühren zugegeben. Die Lösung wird für 1 bis 2 Stunden bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit werden 2,42 g Tris in 80 ml A. dest. gelöst. Der pH-Wert wird mit einer HCl-Maßlösung auf 8,5 eingestellt. Anschließend wird auf ein Volumen von 100 ml mit A. dest. aufgefüllt. 12 ml von der TrisHCl-Lösung werden unter Rühren zum Ansatz hinzugegeben und auf einem Heizrührer für 10 bis 20 Minuten bei 50 °C gelöst. Die ungelösten Bestandteile werden dann für 15 Minuten mit 5.000 g bei RT abzentrifugiert und der Überstand in ein 50 ml Röhrchen überführt. 18 ml dieser Suspension werden mit 0,45 g DABCO gemischt und bei 37 °C gelöst. Das Eindeckungsmittel wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

3.4 Proteinspezifische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentrationen

Zur Ermittlung der Proteinkonzentrationen von Zellysaten wird der BCA-Assay angewendet (Smith *et al.*, 1985; Brown *et al.*, 1989). Dieses System beruht auf der Reduktion von zwei- zu einwertigem Kupfer durch Proteine. Diese reagieren durch das Vorhandensein von Bicinchoninsäure in der Reaktionslösung zu violetten Komplexen, deren maximale Adsorption bei 562 nm liegt. Die Adsorption ist direkt proportional zur Proteinkonzentration.

Bei diesem Test werden 5 µl der zu bestimmenden Proteinlösung mit 1 ml einer 1:50 Verdünnung von Kupfer (II)-Sulfat in Bicinchoninsäure versetzt, gevortext und für 30 Minuten im 37 °C-Wasserbad inkubiert. Nach kurzem Abkühlen des Reaktionsansatzes wird dieser mit dem BCA-Programm im BioPhotometer bei einer Messwellenlänge von 562 nm vermessen und die Proteinkonzentration abgelesen.

3.4.2 Herstellung von Zellysaten

Um ein Zellysate herstellen zu können, werden ca. 10^7 Zellen für 5 Minuten mit 1.200 rpm bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wird zweimal mit 0.5 – 1 ml eiskaltem PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ in der Eppendorf-Mikrozentrifuge für 5 Minuten mit 1.200 rpm bei 4 °C gewaschen und anschließend mit ca. 500 µl NP-40-Lysispuffer für 30 Minuten auf Eis lysiert. Dann werden die Zellkerne für 30 Minuten mit 13.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues beschriftetes (Zelltyp, Datum) Eppendorf-Gefäß überführt und bei –80 °C gelagert.

3.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Proteine können nach ihrer molekularen Masse anhand von (dis)kontinuierlichen 7 bis 14%igen Polyacrylamidgelen elektrophoretisch aufgetrennt werden. Als Standardgele wurden 10%ige Gele verwendet.

Für ein 10%iges großes TRENNGEL:

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	10,6	ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,9)	8	ml
A. dest.	12,9	ml
20 % SDS	160	µl
TEMED	10	µl
10 % APS	280	µl

Die Trenngel-Lösung wird möglichst blasenfrei auf ca. 4 bis 5 cm unter die Kanten der Glasplatten einer entsprechenden Elektrophoresekammer eingegossen, vorsichtig mit A. dest.-gesättigtem Butanol überschichtet und für 0,5 bis 1 Stunde bei RT polymerisiert. Hinterher wird das Butanol gründlich abgenommen und das Trenngel mit Sammelgel überschichtet.

Für das SAMMELGEL:

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	1,3	ml
1 M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25	ml
A. dest.	6	ml
20 % SDS	50	µl
TEMED	10	µl
10 % APS	100	µl

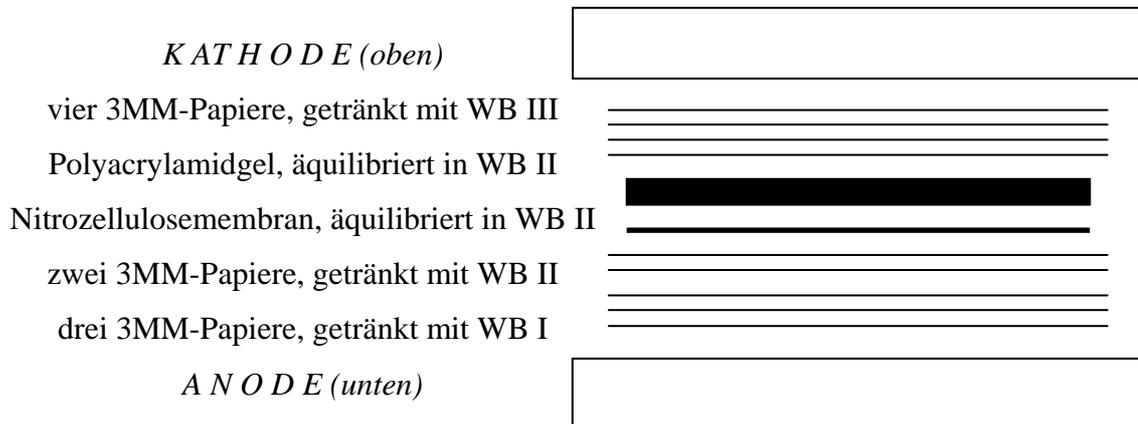
In das noch flüssige Sammelgel wird ein Kamm vorsichtig eingesetzt und das Gel für 30 Minuten bei RT polymerisiert. Die Elektrophoresekammer wird mit 1x Proteingel-Laufpuffer aufgefüllt und der Kamm entfernt. Die somit entstandenen Auftragstaschen werden vor Beladung der Proteinproben mit Proteingel-Laufpuffer sorgfältig

ausgespült. Danach werden die Proteinproben mit 1/6-Volumen SDS-Lämmli-Probenpuffer (mit oder ohne β -Merkaptoethanol) versetzt und 5 Minuten bei 95 °C aufgeköcht. Die Proteinproben sowie ein entsprechender Protein-Größenmarker werden in die Geltaschen geladen. Die Elektrophorese erfolgte für etwa 5 Stunden bei 30 bis 40 mA.

3.4.4 Western-Blot

Die Western-Blot-Methode nach Towbin *et al.*, 1979, dient als Nachweis einzelner Proteine mittels spezifischer Antikörper aus einem Proteingemisch. Dazu werden die durch die PAGE aufgetrennten Proteine aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulose- oder PVDF-Membran übertragen, wobei das Proteinmuster und die Immunaktivität der Proteine erhalten bleiben. Die Übertragung der Proteine erfolgt mittels einer semitrockenen Blottingapparatur, indem ein Stromfluss zwischen Anode und Kathode angelegt wird.

Der Aufbau der Transfereinheit sieht wie folgt aus:



Beim Aufbau der Blotting-Einheit ist darauf zu achten, dass alle Schichten luftblasenfrei aufeinander liegen. Diese können durch Ausrollen einer Glaspipette entfernt werden. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Nitrozellulose- oder PVDF-Transferelement erfolgt innerhalb einer Stunde bei einer Stromstärke von 100 mA.

Der gleichmäßige und auch erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Transfermembran kann durch die Übertragung eines vorgefärbten Protein-Größenmarkers überprüft werden. Außerdem kann der Transfer auch nach der Detektion der Proteine im ECL-System durch eine Nachfärbung der Membran in einer Coomassie-Blaulösung kontrolliert werden.

Nach dem Proteintransfer werden die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Transfermembran mit 10 bis 20 ml (je nach Gelgröße) Blockingpuffer ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ freies PBS mit 10 % Magermilchpulver) auf einem Schüttler 1 Stunde bei RT oder bei 4 °C ÜN blockiert. Der Proteinnachweis auf der Transfermembran erfolgt mittels spezifischer Antikörper. Der Erstantikörper wird mit Blockingpuffer verdünnt und auf einem Schüttler 1 Stunde bei RT inkubiert. Anschließend wird die Transfermembran einmal für 10 Minuten und dreimal für 5 Minuten mit PBST bei RT gewaschen. Dann folgt eine 45-minütige Inkubation der Transfermembran mit einem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper. Nach erneutem Waschen wird die Transfermembran kurz an der Luft getrocknet. Anhand eines ECLTM-Systems werden die Proteine nachgewiesen. Dabei setzt die Meerrettichperoxidase (HRP) ein Substrat um, das auf einem Röntgenfilm die spezifisch markierten Proteinbanden über eine Freisetzung von Photonen schwärzt.

3.4.5 Biotinylierung von Zelloberflächenproteinen

Pro Ansatz werden 10^6 adhärenente Zellen einmal mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) gewaschen. Zur Biotinylierung der Oberflächenproteine werden die Zellen mit je 5 ml des Membranimpermeablen Sulfo-NHS-Biotins mit einer Konzentration von 0,5 mg Biotin pro ml auf einen Schüttler eine Stunde lang bei 4 °C inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit PBS ($\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) dreimal gewaschen, um das nicht gebundene Biotin zu entfernen. Danach wird ein Zellysate hergestellt (Siehe dazu Punkt 3.4.2). Die Detektion von Biotin erfolgt über POX-gekoppeltes Streptavidin mit anschließender Entwicklung mit dem ECLTM-System.

3.4.6 Reinigung von monoklonalen Antikörpern

Hybridom-Zellkulturen werden in Zellkulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 25 bis 75 cm² (stehend oder auch liegend) bei 37 °C kultiviert. Die Zellkulturüberstände von Antikörpern produzierenden Hybridom-Zellkulturen werden über einen längeren Zeitraum gesammelt und bei 4 °C gelagert. Wird ein Überstandsvolumen von mindestens 500 ml erreicht, werden die Ak-haltigen Überstände für 15 Minuten mit 6.000 rpm bei 4 °C abzentrifugiert, um Zellbruchstücke zu entfernen. Anschließend wird der Ak-haltige Überstand mit einem Sterilfilter (0,22 µm Porengröße) filtriert, um kleinste Partikel zu entfernen, die ansonsten später die Ak-bindende Säule verstopfen könnten. Die Ak-haltigen Überstände werden dann über eine Protein G-Säule gepumpt. Die Immunglobuline binden an das Protein G und werden so aus dem Überstand entfernt. Über die Säule wird dann ein Waschpuffer A gepumpt und anschließend werden die gebundenen Ak mit einem sauren Elutionspuffer (pH-Wert 2,7) von der Säule eluiert. Dabei werden diese in Röhrchen mit je 500 µl vorgelegter basischer 1 M Tris-Lösung (pH-Wert 8,9) aufgefangen und sofort gemischt, um den sauren pH-Wert sogleich neutralisieren zu können. ÜN wird gegen fünf Liter PBS dialysiert. Die so gereinigten Ak werden portioniert und bei -20 °C gelagert.

Die zurechtgeschnittenen Dialyseschläuche werden in A. dest. mit 1 mM EDTA 30 Minuten lang gekocht und in frisches A. dest. überführt, autoklaviert und im Kühlschrank bei 4 °C gelagert.

3.4.7 Messung der IDO-Aktivität

Der biochemische Nachweis der intrazellulären Indolamin 2,3-Dioxygenase-Aktivität erfolgt durch die Ermittlung der Kynureninkonzentration im Überstand aktivierter Zellen. Dieser Nachweis beruht auf dem Abbau der essentiellen Aminosäure L-Tryptophan zu N-Formylkynurenin bzw. zu Kynurenin. Die Konzentration an Kynurenin kann durch Zusatz von Ehrlich-Reagenz, 4-(Dimethylamino)benzaldehyd, photometerisch nachgewiesen werden und ist direkt proportional zur IDO-Aktivität.

3×10^4 Zellen pro Well werden in einer 96-Well-Zellkulturplatte ausgesät. Diese Zellen werden mit verschiedenen Konzentrationen an IFN- γ im 37 °C-Brutschrank 3 Tage lang stimuliert. Zusätzlich werden dem Medium (IMDM mit 5 % FKS) noch 100 $\mu\text{g/ml}$ L-Tryptophan zugesetzt. Dann werden jedem Well 160 μl Überstand abgenommen und in eine 96-Well-Platte mit Spitzkonus (GREINER) transferiert. Nach Zugabe von 10 μl /Napf 30%iger Trichloressigsäure werden die Platten in einem 50 °C-Wasserbad für 30 Minuten inkubiert, um N-Formylkynurenin zu hydrolysieren. Anschließend wird die Platte für 10 Minuten mit 1.800 rpm bei RT zentrifugiert. 100 μl Überstand pro Well werden auf eine 96-Napf-Platte mit Flachboden übertragen. Zur Bestimmung des Kynurenin Gehaltes werden 100 μl /Napf von frisch angesetztem Ehrlich-Reagenz in Essigsäure zugegeben. Die Konzentration an Kynurenin, optisch auch an einem gelblichen Farbumschlag erkennbar, wird bei einer Wellenlänge von 492 nm gemessen. Die unstimulierten Zellen dienen als Negativkontrolle.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Herstellung kompetenter Bakterien

Aus einer Dauerkultur wird der *E. coli*-Stamm DH5 α oder der *E. coli*-Stamm XL10 Gold auf einer LB-Agar-Platte ausgestrichen. Mit einer Einzelkolonie dieser Kulturplatte werden 10 ml LB-Medium als Vorkultur angeimpft und im Schüttler bei 37 °C ÜN inkubiert. 1 ml dieser Übernachtskultur wird zusammen mit 100 ml LB-Medium in einen Erlenmeyerkolben pipettiert. Dieser wird in einem Schüttler (150 – 200 rpm/Minute) für 2 bis 3 Stunden bei 37 °C inkubiert. Die Bakteriendichte wird regelmäßig kontrolliert, um das Bakterienwachstum in der logarithmischen Phase zu erfassen. Die Inkubation der Kultur wird bei einer Optischen Dichte (OD₆₀₀) von 0,2 - 0,3 eingestellt. Anschließend wird die Bakteriensuspension 5 Minuten auf Eis gekühlt und für 10 Minuten mit 2.500 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird in 40 ml TjbI-Puffer resuspendiert und für 10 Minuten mit 3.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und dem Bakterienpellet werden 4 ml TjbII-Puffer zugegeben, gevortext und für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Die Bakterienlösung wird anschließend in sterile Kryoröhrchen aliquotiert und bei –80 °C oder im flüssigem Stickstoff eingefroren.

3.5.2 Transformation kompetenter Bakterien

50 μ l kompetente Bakterien werden mit 1 μ l Plasmid-DNA (10 μ g/ μ l) in einem vorgekühlten Eppendorf-Gefäß 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 2 Minuten im Wasserbad bei 42 °C wird die Reaktion für 5 Minuten auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 950 μ l LB-Medium (ohne Antibiotikum) für 1 Stunde im 37 °C-Schüttler inkubiert. Dann werden 50 μ l der Bakterienkultur auf eine LB-Platte ohne Antibiotikum, die als Kontrollplatte dient, verteilt. Weitere 50 μ l werden auf einer LB-Platte mit Antibiotikum (entsprechend dem Resistenzgen) ausplattiert. Die Agarplatten werden im Bakterienbrutschrank bei 37 °C ÜN inkubiert. Am nächsten Tag

werden 3 bis 4 Einzelkolonien von der Platte mit Antibiotikum gepickt und in 3 ml LB-Medium mit Antibiotikum für 6 Stunden oder ÜN im Schüttler inkubiert. Diese Bakterienkultur wird dann für eine Mini-Plasmid-Präparation verwendet. Die Agarplatten werden mit Parafilm gegen das Austrocknen verschlossen. Diese können für mehrere Wochen im 4 °C-Kühlraum aufbewahrt werden.

3.5.3 Isolation extrachromosomaler DNA aus Bakterien (Mini-Plasmid-Präparation)

Zur Isolation extrachromosomaler DNA aus Bakterien wird der QIAprep[®] Spin MiniprepKit verwendet. Nach dem QIAprep Spin Miniprep Kit Protokoll (für Mikrozentrifugen) können bis zu 20 µg Plasmid-DNA (“*high copy*“) von einer 1 bis 5 ml Übernachtskultur in LB-Medium gereinigt werden.

Zur Präparation wird eine Bakterienkultur in 5 ml LB-Medium mit Antibiotikum (100 µg/ml Ampicillin) angesetzt. Bei einer OD₆₀₀ von ca. 0,8 werden die Zellen 10 Minuten mit 4.000 rpm bei 4 °C zentrifugiert und das Bakterienpellet in 250 µl gekühlten Resuspensionspuffer P1 (+ RNase A) aufgenommen. Zur Lyse der Bakterien wird 250 µl Lysepuffer P2 zugegeben, vorsichtig 4 bis 6 mal invertiert und dann 350 µl Neutralisationspuffer N3 zugegeben. Die Lösung wird nach mehrmaligen Invertieren für 10 Minuten mit 13.000 rpm (17.900 × g) in der Eppendorf-Mikrozentrifuge zentrifugiert. Anschließend wird die Suspension auf die QIAprep[®] Spin Säule geladen und für 1 Minute bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Durchfluss “*flow-through*“ wird entfernt und die Säule mit 750 µl Puffer PE mit einer 1-minütigen Zentrifugation bei 13.000 rpm gewaschen. Der Durchfluss wird erneut entfernt und die Säule nochmals zentrifugiert, um die Reste des Waschpuffers gänzlich zu entfernen. Die Säule wird in ein neues Eppendorf-Gefäß gegeben und mit 50 µl Elutionspuffer EB (10 mM Tris-Cl, pH 8,5) versetzt. Nach einer 1-minütigen Inkubation bei RT wird die Plasmid-DNA durch eine Zentrifugation für 2 Minuten mit 13.000 rpm eluiert.

3.5.4 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Bestimmung der Konzentrationen von DNA und RNA erfolgt mittels eines BioPhotometers (Eppendorf). Die Nukleinsäuren werden in A. dest. verdünnt und in Quarzglasküvetten oder UVetten[®] (Eppendorf) pipettiert. Die direkte Messung der Optischen Dichte (Extinktion) erfolgt bei einer Wellenlänge von 260 nm unter der Annahme folgender Methodenfaktoren:

$$1 E_{260} = 40 \mu\text{g RNA/ml}$$

$$1 E_{260} = 37 \mu\text{g ssDNA/ml}$$

$$1 E_{260} = 50 \mu\text{g dsDNA/ml}$$

Eine Verunreinigung der Nukleinsäurelösungen durch Proteine kann durch Messung der Extinktion bei 280 nm festgestellt werden. Der Quotient aus der Extinktion bei 260 nm und der Extinktion bei 280 nm (E_{260}/E_{280}) kann als Qualitätskontrolle verwendet werden und gibt zugleich den Reinheitsgrad der Nukleinsäuren wieder. Reine RNA-Präparationen weisen einen Quotienten von 2,0 und reine DNA-Präparationen einen von 1,8-2,0 auf.

3.5.5 Plasmid Restriktion

Die Restriktion bzw. der Verdau von Plasmiden (Vektoren) erfolgt mittels Restriktionsendonukleasen, die während 1 bis 3 Stunden im Heizblock (37 °C) an gezielten Erkennungssequenzen, in der Regel vier bis acht Basenpaare DNA, schneiden. Restriktionsenzyme werden aus Bakterien gewonnen und dienen dort der Abwehr bzw. Restriktion von Bakteriophagen und deren Nukleinsäuren. Durch den Verdau kann man DNA-Fragmente mit genau definierten Enden schaffen. Es gibt Restriktionsenzyme, die 5'- oder 3'-Einzelstrangüberhänge ("*sticky ends*") oder glatte, doppelsträngige Enden ("*blunt ends*") erzeugen.

Die Reaktion für einen Restriktionsverdau wird folgendermaßen in einem Eppendorf-Gefäß angesetzt:

1 µg Plasmid
2 µl Restriktionspuffer (10x)
0,5 µl Restriktionsenzym (10U/ml)
auf 20 µl mit A. dest. auffüllen

3.5.6 Plasmid Dephosphorylierung

Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wird der restriktionsverdaute Vektor mittels einer Phosphatase, der "*calv intestine phosphatase*" (CIP) oder der "*shrimp alkaline phosphatase*" (SAP) im 37 °C-Heizblock für 30 Minuten dephosphoryliert.

Die Reaktion, bei welcher die 5'-Phosphatgruppe von Vektoren entfernt wird, ist folgendermaßen in einem Eppendorf-Gefäß angesetzt worden:

1-10 pmol restriktionsverdautes Plasmid
5 µl Reaktionspuffer (10x)
1-10 µl Phosphatase (1U/µl)
auf 40 µl mit A. dest. auffüllen

Die Enzymaktivität wird anschließend durch eine 15-minütige Inkubation bei 85 °C für CIP oder 65 °C für SAP gestoppt.

3.5.7 Plasmid Ligation

Zur Ligation der kohäsiven Enden eines Genfragments und des dephosphorylierten Vektors werden Vektor und Fragment im molaren Verhältnis von 1:3 oder 1:5 eingesetzt. Als Enzym ist die T4-DNA-Ligase für die Ligation von DNA Fragmenten besonders empfehlenswert, weil dadurch sowohl komplementäre "*blunt ends*" als auch

“*sticky ends*“ ligiert werden können. Die Ligationen können bei 14 °C ÜN oder 1 bis 4 Stunden bei RT (20-25 °C) durchgeführt werden.

Ein Standard-Ligationsansatz besteht aus folgenden Komponenten:

- 3 µl Vektor-DNA (60 fmol)
- 9 µl Insert-DNA (20 fmol)
- 4 µl T4-DNA-Ligationspuffer (5x)
- 3 µl T4-DNA-Ligase (1U/µl)
- 1 µl ddH₂O

3.5.8 DNA und RNA Gelelektrophorese

Die Gelelektrophorese dient zur Kontrolle von DNA- und RNA-Präparationen und zur Dokumentation von PCR-Amplifikationen. Die Agarose-Gelelektrophorese nach Sambrook *et al.* 1989, ist eine Methode zur Trennung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Größe und der damit im Gel verbundenen unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten. Kleinere Fragmente der negativ geladenen DNA wandern in einer elektrisch neutralen Gelmatrix (Agarose) schneller in Richtung Anode als größere Fragmente.

Agarose wird als Pulver in Konzentrationen von 0,5 – 2 % in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle dreimal aufgeköcht, bis eine klare Lösung entsteht. Nach Abkühlen auf ca. 50 °C und Zugabe einer Ethidiumbromidlösung (Endkonzentration von 1 µg/ml) wird die Agarose-Lösung in einen Gelträger gegossen und ein entsprechender Kamm zur Erzeugung der Auftragstaschen eingesetzt. Nach Polymerisation des Agarosegels wird der Gelträger in die Elektrophoreseapparatur mit Elektrophorese-Puffer (1x TAE) eingesetzt und der Kamm aus dem Gel gezogen. Das Gel wird mit den DNA-Proben, die zuvor mit 1/10 Volumen Farbpuffer versehen werden, beladen. Nach dem Elektrophoreselauf bei 1,2 V/cm² werden die entsprechend ihrer Größe aufgetrennten DNA-Moleküle im Transilluminator unter UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.5.9 Reverse Transkription

Bei der Reversen Transkription wird die isolierte RNA mittels Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primer, die sich an das polyadenylierte Ende der messenger RNAs anlagern, und dem Enzym Reverse Transkriptase (SuperScript-II™) in einzelsträngige komplementäre DNA (cDNA) umgeschrieben. Die stabile cDNA wird dann als Matrize für die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR) genutzt.

Der Reaktionsansatz für die cDNA-Synthese setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen und wird in RNase-freie PCR-Gefäße (0,5 ml) pipettiert:

1 µl Oligo-(dT)₁₂₋₁₈-Primer (500 µg/ml)
1 µl ddNTP Mix (0,5 mM je NTP)
1 ng – 5 µg Gesamt-RNA
auf 12 µl mit DEPC-H₂O auffüllen

Diese Ansatz wird für 5 Minuten bei 65 °C zur Denaturierung bzw. Trennung des Einzelstranges erhitzt und dann auf Eis abgekühlt. Darauf werden folgende Komponenten zugefügt:

4 µl RT-Puffer (5x)
2 µl Dithiothreitol (DTT) (0,1 M)
1 µl RNase OUT Recombinant Ribonuclease Inhibitor (40 U/ml)

Der Reaktionsansatz wird dann gemischt, kurz abzentrifugiert und für 2 Minuten bei 42 °C inkubiert. Dann wird 1 µl der Reversen Transkriptase (SuperScript-II™) zugefügt, gut resuspendiert und für 50 Minuten bei 42 °C inkubiert. Das Enzym kann durch Erhitzen auf 70 °C für 15 Minuten inaktiviert werden. Die cDNA kann bei –20 °C oder –80 °C gelagert werden.

3.5.10 Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR)

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (*“polymerase chain reaction“*, PCR) ist eine *in vitro*-Technik, die vom Nobelpreisträger Kary Mullis im Jahre 1985 entwickelt wurde (Saiki *et al.*, 1985). Mit dieser Methode kann man gezielt DNA-Abschnitte, die von zwei bekannten DNA-Sequenzen eingerahmt werden, amplifizieren bzw. vervielfältigen. Die PCR ist ein zyklisches Verfahren, bei dem sich in jeder neuen Runde die Anzahl der DNA-Kopien mittels DNA-Polymerasen verdoppelt. Durch Erhitzen bzw. Denaturieren werden die DNA-Stränge der Ziel-DNA getrennt und durch anschließendes Kühlen der Reaktion können sich die Primer spezifisch an die Zielsequenz anlagern (*“annealing“*). Bei den Primer handelt es sich um kurze, einzelsträngige, chemisch synthetisierte DNA-Moleküle, die komplementär zu den Enden einer definierten Sequenz der DNA-Matrize sind. Die DNA-Polymerase verlängert unter den entsprechenden Reaktionsbedingungen und in Gegenwart von Desoxynukleosidtriphosphaten (ddNTPs) die Primer entlang der einzelsträngigen denaturierten DNA-Matrize. Dadurch werden neue komplementäre DNA-Stränge synthetisiert. In der Regel werden diese Zyklen 20 bis 40 mal wiederholt und die Kopienzahl läßt sich nach Abschluß der Reaktion nach folgender Gleichung $(2^n - 2n) \times$ berechnen. Die PCR-Produkte bzw. Amplikons enthalten an ihren Enden die Oligonukleotidsequenzen der Primer, die man sich bei der nachfolgenden Sequenzierung der DNA-Stücke zu Nutze machen kann.

Ein allgemeiner PCR-Zyklus sieht wie folgt aus:

Start-Denaturierung	95 °C 2 Minuten	
Denaturierung	95 °C 1 Minuten	} 20-40 Zyklen
Annealing	X °C 1 Minuten	
Extension	72 °C Y Minuten	
End-Extension	72 °C 7 Minuten	

Beim Annealing-Schritt richtet sich die Temperatur nach der Schmelztemperatur der Primer und der Stringenz der PCR. Die Dauer des Extension-Schrittes entscheidet die Länge des zu amplifizierenden DNA-Fragmentes. Als Richtwert gilt 1 Minute pro 1000 bp an DNA.

Der Reaktionsansatz für die PCR enthält folgende Komponenten:

0,1-1 µg cDNA
5 µl Taq-Puffer (10x)
5 µl dNTP-Mix
2,5 µl MgCl₂ (25 mM)
50 pM 5' (forward) Primer
50 pM 3' (reverse) Primer
0,5 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
auf 50 µl mit A. dest. auffüllen

Es können auch PCR-Beads (puReTaq Ready-To-Go, Amersham Biosciences) für die PCR-Reaktion verwendet werden. Diese bei RT stabilen Kügelchen enthalten Stabilisatoren, Bovines Serum Albumin, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, 2,5 Units puReTaq DNA Polymerase und Reaktionspuffer. Wenn das PCR-Bead in einem Endvolumen von 25 µl ddH₂O gelöst wird, liegen die dNTPs in einer Konzentration von 200 mM in 10 mM Tris-HCl, (pH 9,0 bei RT), 50 mM KCl und 1,5 mM MgCl₂ vor.

Folgender Ansatz wird in einem Eppendorf-Gefäß zusammenpipettiert:

2 µl cDNA aus der Reversen Transkription
X µl 5' (forward) Primer (5-25 pmol)
Y µl 3' (reverse) Primer (5-25 pmol)
auf 25 µl mit A. dest. auffüllen
+ PCR-Bead

Die Ansätze werden gemischt, kurz abzentrifugiert und, falls erforderlich, bei Benutzung einem PCR-Cycler ohne beheizbaren Deckel mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

3.5.11 DNA-Sequenzierung

Zur Sequenzierung von DNA-Fragmenten werden DNA-Moleküle in einem zyklischen Prozess denaturiert, so dass ein Sequenzierprimer daran binden kann. Dieser gebildete DNA-Primer-Doppelstrang wird dann durch DNA-Polymerasen verlängert. Diese Art der Sequenzierung beruht auf dem Prinzip der Kettenabbruch-Reaktion (Sanger *et al.*, 1977), wobei fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleotide zum Kettenabbruch führen.

Für den Sequenzieransatz wird der BigDye-Mix (BigDyeTM Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit, PE Applied Biosystem, Weiterstadt) verwendet. Die Wahl des Sequenzierprimers (SeqPrimer) richtete sich nach der DNA-Matrize.

Ein Sequenzieransatz wird in DNase und RNase freien PCR-Gefäßen (0,2 ml, 8-fach) wie folgt zusammenpipettiert:

- 1 µl BDT
- 1 µl SeqPrimer (5 pmol/µl)
- 1 µl Sequenzierpuffer (2,5x)
- 2 µl DNA-Matrize*

* Wird als DNA-Matrize eine Plasmid-DNA verwendet, dann sollten 50 ng/µl eingesetzt werden. Wird hingegen ein PCR-Produkt als Matrize genommen, dann sollten 5 fmol/µl benutzt werden.

Der Ansatz wird gevortext, kurz abzentrifugiert und in einen Thermocycler mit folgenden Sequenzier-PCR-Programm gegeben.

25 Zyklen

95 °C 30 Sekunden

50 °C 15 Sekunden

60 °C 4 Minuten

Nach der PCR-Amplifikation kann der Sequenzieransatz noch aufgereinigt werden, indem dieser auf 100 µl mit A. dest. aufgefüllt wird. Die DNA wird mit 10 µl 3 M

Natriumacetat (pH 5,2) und 250 μ l 100 % Ethanol (RT) und einem Zentrifugationsschritt für 20 Minuten mit 13.000 rpm bei RT gefällt. Das Pellet wird zweimal mit 70 % Ethanol bei RT gewaschen. Anschließend wird dieses kurz an der Luft getrocknet und in 25 μ l Hi-Di-Formamid mehrmals resuspendiert. Dann wird der Sequenzieransatz elektrophoretisch in einem denaturierenden Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die unterschiedlichen Fluorophore, die eine spezifische Base darstellen, werden durch einen Laser angeregt. Dadurch wird die Emissionsstrahlung detektiert und die Sequenzinformation mittels eines entsprechenden Software-Programmes ermittelt. Die Elektrophorese und die Übertragung der Sequenzierdaten erfolgt in einem Sequenzierautomat ABI PrismTM377 (PE Applied Biosystem, Weiterstadt).

3.5.12 *In vitro*-Mutagenese

Bei der *in-vitro* Mutagenese wurde der QuikChange[®] II site-directed Mutagenese Kit (Stratagene) verwendet. Bei dieser Technik können Punktmutationen und einzelne oder mehrere Aminosäuren in einer Zielsequenz eines doppelsträngigen Plasmids eingesetzt oder entfernt werden. Komplementäre Primer, welche die Mutation enthalten, werden in einem Denaturierungszyklus an die Zielsequenz angeheftet und die PfuUltraTM HF (*“high fidelity“*) DNA-Polymerase synthetisiert die neue mutierte Sequenz. Anschließend verdaut die Endonuklease *DpnI* (Zielsequenz: 5'- Gm⁶ATC- 3') die Ausgangs-DNA-Matrize, so dass die mutierte Sequenz übrigbleibt.

Zuerst müssen optimale Primer, welche die gewünschte Mutation(en) enthalten, gefunden werden. Dazu wurde von der Firma Stratagene ein spezielles Design Software Programm (<http://labtools.stratagene.com/QC>) entwickelt, um mittels einer beliebigen Sequenz optimale mutagene Oligonukleotide zu konstruieren. Optimale Primer enthalten 25 bis 45 Basen und weisen eine Schmelztemperatur (T_m) von ≥ 78 °C auf.

4 Ergebnisse

4.1 Nachweis von Mykoplasmen

Mykoplasmen sind zellwandlose Bakterien, die in der Zellkulturforschung ein häufiges Problem darstellen. Die Kontamination einer Zellkultur mit Mykoplasmen ist visuell oder lichtmikroskopisch nicht zu erkennen, aber sie ändert die Stoffwechselfparameter der Zellen nachhaltig (Langdon, 2004). Eine hochsensitive und meist zuverlässige Methode ist die Überprüfung einer Mykoplasmeninfektion per PCR.

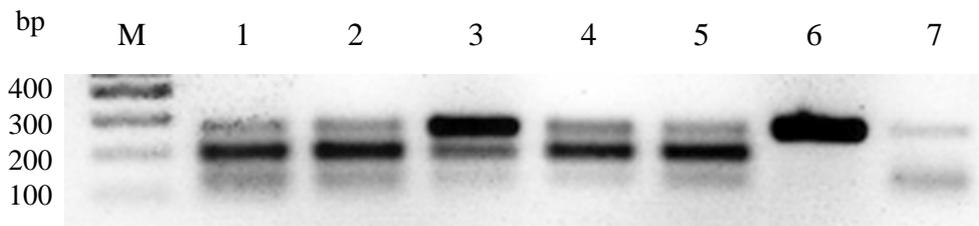


Abbildung 4.1: Mykoplasmen PCR.

Die Zellen wurden ohne Antibiotikum 3 Tage lang kultiviert. Anschließend wurden jeweils 100 µl des Überstandes für 5 Minuten bei 95°C aufgeköcht und die Mykoplasmen per PCR nachgewiesen. 10 µl des PCR-Produktes von CHO-Zellen (Gelspur 1), CHO-SLAM (Gelspur 2), CHO-CD46 (Gelspur 3), HBMECs, p18 (Gelspur 4) und HUVECs, p1 (Gelspur 5) wurden auf ein 1,5%iges Agarose-Gel aufgetragen. Gelspur 6 stellt die positive Kontrolle bei 270 bp dar. Gelspur 7 weist die interne Kontrolle als Negativkontrolle auf. M steht für die 100 bp-DNA Gene Ruler™ Leiter.

In der Abbildung 4.1 kann man erkennen, dass nur die Zelllinie CHO-CD46 mit Mykoplasmen kontaminiert ist, da die obere Bande in der Gelspur 3 der positiven Kontrolle in der Gelspur 6 mit einer Länge von 270 bp entspricht. Alle übrigen Zellen,

besonders die Gehirn-Endothelzelllinie (HBMEC) mit der Passage 18 und die frisch isolierten primären EZ aus der Nabelschnurvene (HUVECs) mit der Passage 1, weisen keine Kontamination mit Mykoplasmen auf.

4.2 Nachweis von bekannten Masernrezeptoren

4.2.1 Nachweis von hCD46- und hCD150-Transkripten in EZ

MV-Vakzine benutzen CD46 und CD150 als Rezeptor. MV-Wildtypstämme hingegen gelangen nur über CD150 in die Wirtszelle (Tatsuo *et al.*, 2001; Dhiman *et al.*, 2004). Daher wurde zuerst anhand einer RT-PCR getestet, ob humane EZ (HBMECs und HUVECs) die MV-Rezeptoren (CD46 und CD150) als Transkriptionsprodukt exprimieren.

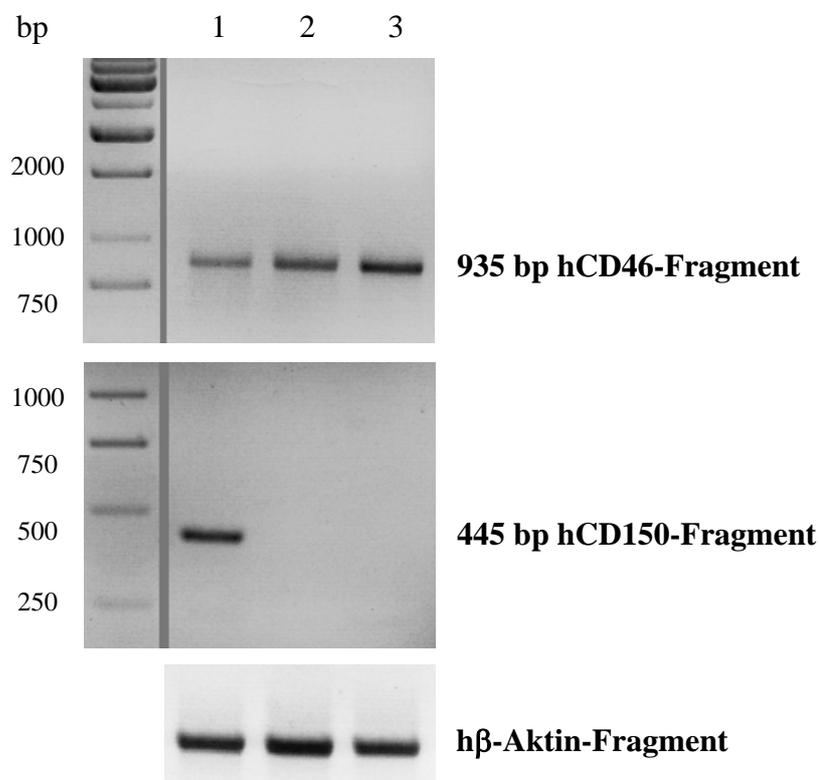


Abbildung 4.2: Humane CD46 (MCP)- und humane CD150 (SLAM)-spezifische mRNA Expression.

Mittels RT-PCR wurden von BJAB-Zellen (Gelspur 1), HBMECs (Gelspur 2) und HUVECs (Gelspur 3) ein 935 bp großes CD46-Fragment und ein 445 bp großes CD150-Fragment amplifiziert. Als RT-PCR Kontrolle diente ein β -Aktin-Amplikon.

In der Abbildung 4.2 konnte das humane CD46 (MCP) mit spezifischen Primerpaaren als 935 bp Fragment in den EZ amplifiziert werden. Als Kontrolle diente die humane B-Zelllinie BJAB, die das humane CD46 konstitutiv exprimiert. Ferner konnte das humane CD150 (SLAM) mit spezifischen Primerpaaren als 445 bp Fragment weder in den humanen Gehirnendothelzellen (HBMECs) noch in den EZ aus der Nabelschnurvene (HUVECs) amplifiziert werden. In der humanen B-Zelllinie BJAB hingegen wird das humane SLAM konstitutiv exprimiert. Als RT-PCR Kontrolle wurde zusätzlich noch ein β -Aktin-Fragment amplifiziert.

4.2.2 Nachweis von hCD46- und hCD150-Protein in EZ

Um eine mögliche Interaktion von MV H-Proteinen mit den EZ festzustellen, wurde anhand der Western-Blot-Methode getestet, ob die MV-Rezeptoren (CD46 und CD150) als Translationsprodukt exprimiert werden. Durch eine Expression der Rezeptoren kann eine Rezeptorvermittelte Aufnahme der MV erfolgen.

In Abbildung 4.3 wurde anhand der Western-Blot-Methode unter nicht reduzierenden Bedingungen, d.h. ohne β -Merkaptoethanol (β -ME), die CD46-Expression detektiert. Man erkennt bei der EBV-transformierten B-Zelllinie B95a keine CD46-Expression, weil diese eine verkürzte Form ohne CCP/SCR1 exprimiert. Der verwendete monoklonale Antikörper α CD46 (13/42, IgG1) bindet nämlich an die erste extrazelluläre Domäne (CCP/SCR1) des CD46-Proteins (Buchholz *et al.*, 1997; Schneider-Schaulies *et al.*, 1995 a,b). Die humane B-Zelllinie BJAB, die Endothelzelllinie HBMEC, die primären EZ HUVECs und die Lungen-Epithelzelllinie A549 zeigen eine deutliche Proteinexpression des CD46-Moleküls. CD46 zeigt bei der B-Zelllinie BJAB ein höheres Molekulargewicht als bei den Endothelzellen (HBMECs und HUVECs) und der Epithelzelllinie A549 auf.

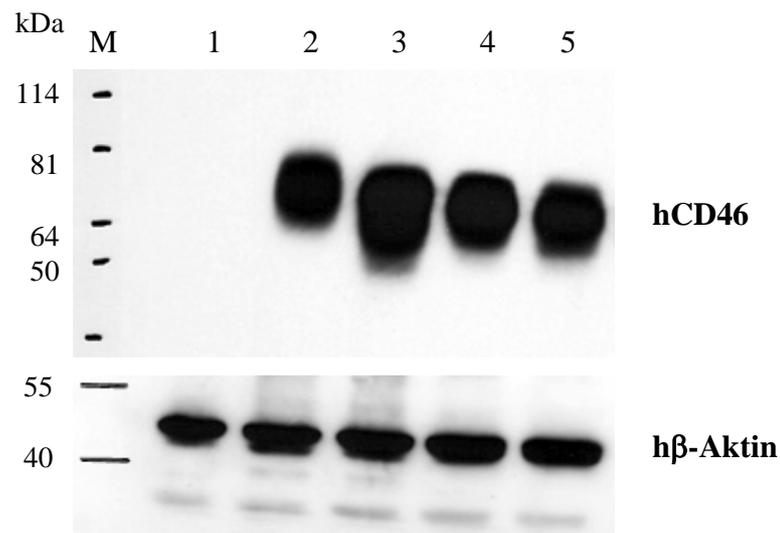


Abbildung 4.3: Humane CD46 (MCP)-spezifische Proteinexpression.

Mittels Western-Blot wurde das humane CD46 in der EBV-transformierten Krallenaffen-Zelllinie B95a (Gelspur 1), der humanen B-Zelllinie BJAB (Gelspur 2), HBMECs (Gelspur 3), HUVECs (Gelspur 4) und der Lungen-Epithelzelllinie A549 (Gelspur 5) nachgewiesen. Als Ladekontrolle wurde zusätzlich β -Aktin detektiert. M steht für Bench MarkTM Prestained Protein Leiter.

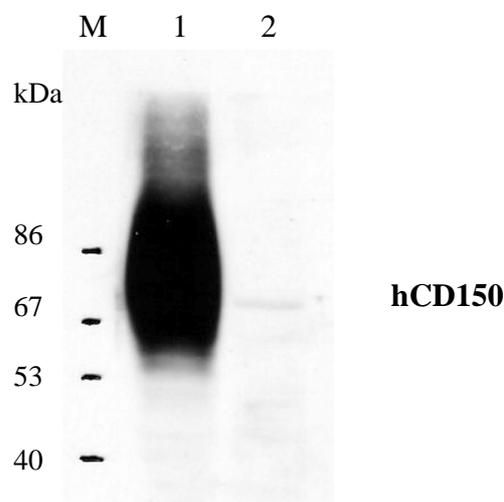


Abbildung 4.4: Humane CD150 (SLAM)-spezifische Proteinexpression.

Mittels Western-Blot wurde das humane CD150 auf der Affenzelllinie B95a (Gelspur 1) und auf den humanen HBMECs nachgewiesen (Gelspur 2). M steht für Bench MarkTM Prestained Protein Leiter.

In Abbildung 4.4 wurde anhand der Western-Blot-Methode unter nicht reduzierenden Bedingungen die SLAM Proteinexpression detektiert. Man erkennt bei der EBV-transformierten B-Zelllinie eine eindeutige SLAM-Expression. Der verwendete monoklonale Antikörper α SLAM (5C6, IgG1) (Erlenhoefer *et al.*, 2001) erkennt kein SLAM auf den humanen mikrovaskulären Gehirndothelzellen (HBMECs).

4.2.3 Induzierbarkeit von SLAM

SLAM kann auf Proteinebene in primären Monozyten durch Phytohämagglutinin (PHA) (8,8%), bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) (6,5%), UV-inaktiviertes MV (UV-MV) (12,2%) und infektiöses MV (6,3%) induziert werden (Minagawa *et al.*, 2001). Dendritische Zellen (DZ) exprimieren SLAM nach CD40-Aktivierung (Polacino *et al.*, 1996). Ferner zeigen reife DZ eine SLAM-Expression sowohl als Transkript als auch auf der Zelloberfläche. Letztere kann zusätzlich durch Interleukin-1 β verstärkt werden (Kruse *et al.*, 2001). Daher lag es nahe festzustellen, ob aktivierte humane EZ SLAM exprimieren.

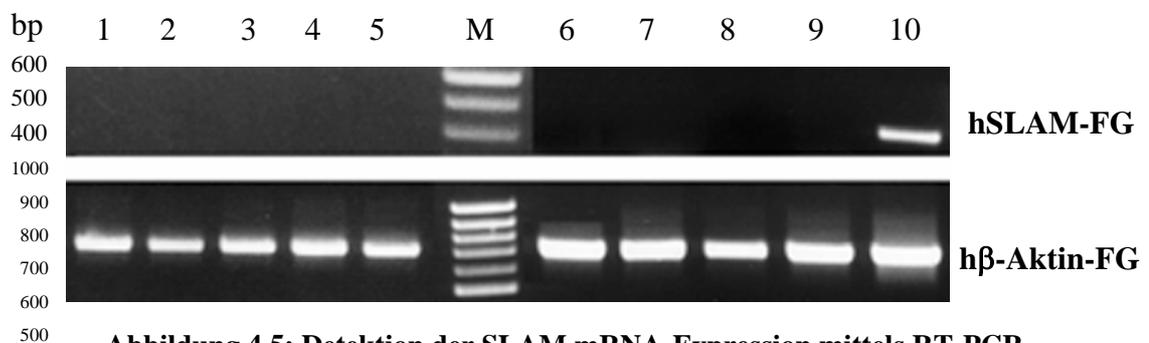


Abbildung 4.5: Detektion der SLAM mRNA-Expression mittels RT-PCR.

Gesamt-RNA wurde aus HBMECs (Gelspur 1), die mit TNF- α (20 ng/ml; Gelspur 2), GM-CSF (100 U/ml; Gelspur 3), LPS (1 μ g/ml; Gelspur 4), IFN- α (10 ng/ml; Gelspur 5), LPS (1 ng/ml; Gelspur 6), IFN- γ (1 ng/ml; Gelspur 7), UV-MV (TC5679 vom 25.06.1998; $2,7 \times 10^7$ pfu/ml; Gelspur 8) und PamCSK (2,5 μ g/ml; Gelspur 9) stimuliert wurden, extrahiert und eine RT-PCR mit SLAM-spezifischen Primerpaaren durchgeführt. Gelspur 10 stellt ein SLAM-spezifisches PCR-Produkt aus BJAB-Zellen als positive Kontrolle dar. Zusätzlich wurde ein β -Aktin-Fragment als Kontrolle für die RT-PCR amplifiziert. M steht für die 100 bp-DNA Gene RulerTM Leiter.

Die Abbildung 4.5 zeigt, dass humane mikrovaskuläre EZ (HBMECs) durch die Behandlung mit Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor (GM-CSF), Interferon (IFN)- α , IFN- γ , LPS, Pam 3 CysSerLys 4 (PamCSK), Tumornekrosefaktor (TNF)- α und mit UV-MV nicht zur SLAM-Expression stimuliert werden können.

4.3 Infektion primärer EZ mit MV

Masernviren können während akuter und persistenter Infektionen Endothelzellen der Haut, des Gehirns und anderer Organe infizieren (Cosby & Brankin, 1995). Deshalb wurden primäre Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) mit dem MV-Impfstamm Edmonston und mit verschiedenen Wildtypmasernvirusisolaten infiziert.

4.3.1 MV-H Expression auf EZ

Um eine Infektion primärer EZ durch MV feststellen zu können, wurden HUVECs mit den Masernvirusstämmen (Edm, Wü4797, Wü5679 und WTFb) mit einer MOI = 0,1 infiziert. Nach 40 Stunden wurden die Zellen abgelöst und für die Durchflusszytometrie (FACS) verwendet.

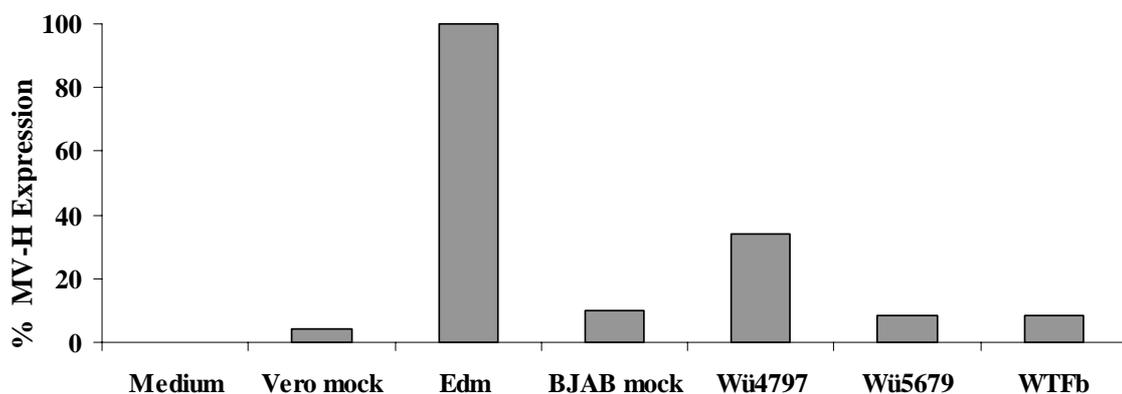


Abbildung 4.6: MV-H Oberflächenexpression auf HUVECs.

HUVECs wurden mit den MV Edm, Wü4797, Wü5679 und WTFb mit einer MOI = 0,1 für 40 Stunden infiziert. Anschließend wurde mittels FACS das Oberflächenglykoprotein H der MV mit dem Antikörper K4 (1:100) gefärbt. Als Mock Kontrolle wurden Vero mock und BJAB mock verwendet. Als negative Kontrolle wurden uninfizierte Zellen verwendet (Medium). Die Signale für die Fluoreszenzintensität der Edm-infizierten Zellen wurden als 100% genommen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten (N=3).

4.3.2 CD46-Expression auf EZ

MV binden an die Wirtszellen durch Interaktion der viralen Glykoproteine mit den zellulären Rezeptoren. CD46 oder auch Membran Cofaktor Protein (MCP) spielt eine Rolle in der Komplementlyse und dient als Rezeptor für attenuierte MV-Stämme (Dörig *et al.*, 1993; Naniche *et al.*, 1993a,b). Um eine Modulation von CD46 auf EZ feststellen zu können, wurden HUVECs mit den Masernvirusstämmen (Edm, Wü4797, Wü5679 und WTFb) infiziert. Nach 40 Stunden wurden die Zellen abgelöst und eine Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie (FACS) durchgeführt.

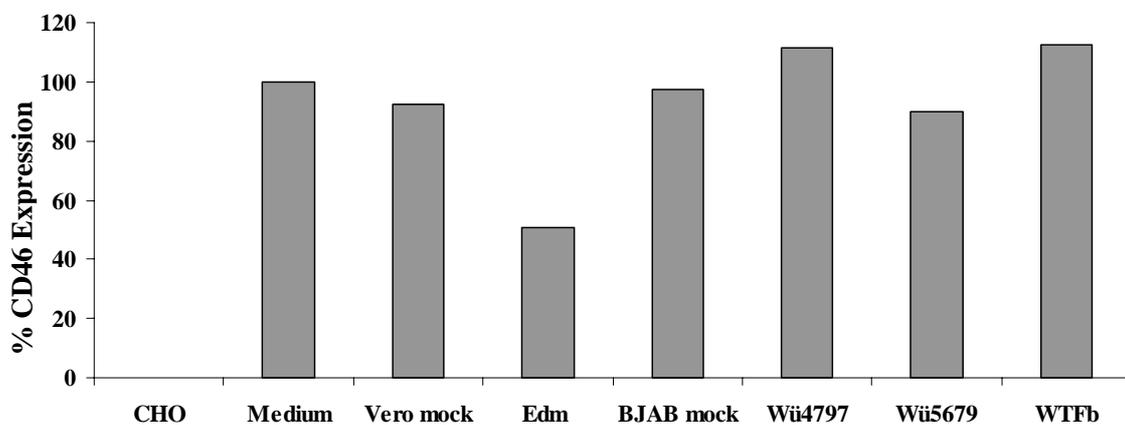


Abbildung 4.7: CD46 Oberflächenexpression auf HUVECs.

HUVECs wurden mit den MV Edm, Wü4797, Wü5679 und WTFb mit einer MOI = 0,1 für 40 Stunden infiziert. Anschließend wurde eine CD46-Oberflächenfärbung mit dem Antikörper 13/42 (1:100) durchgeführt. Als zusätzliche Kontrollen wurden Vero mock und BJAB mock

verwendet. Als negative Kontrolle wurden CHO-Zellen verwendet (CHO). Die Signale für die Fluoreszenzintensität der HUVEC-Zellen (Medium) wurden als 100% genommen. Die Werte entsprechen dem Mittelwert von drei unabhängigen Experimenten (N=3).

In der Abbildung 4.6 wurde anhand der FACS-Analyse die Infektion der HUVECs mit den verschiedenen MV-Stämmen dargestellt. Als Parameter für die Infektion diente die Detektion des viralen Oberflächenglykoproteins Hämagglutinin (H) der MV. An der Höhe der Balken erkennt man eine deutliche H-Proteinexpression bei den MV-Stämmen Edm (100%) und Wü4797 (40%). Die H-Proteinexpression bei den Stämmen Wü5679 und WTFb ist mit der Kontrolle BJAB mock vergleichbar.

In der Abbildung 4.7 wurde anhand der FACS-Analyse die Expression von CD46 auf der Oberfläche der HUVECs detektiert. Als negative Kontrolle wurde die Hamsterepithelzelllinie CHO (CHO-K1, Ovar) verwendet, da diese kein humanes CD46 auf der Oberfläche exprimiert. An der Höhe der Balken lässt sich veranschaulichen, dass HUVECs eine deutliche CD46-Expression auf deren Oberfläche aufweisen (100%). Hinzu lässt sich eine deutliche Downregulation des CD46-Proteins von der Oberfläche der Edm-infizierten HUVECs erkennen (50%). Die MV-Wildtypstämme Wü4797, Wü5679 und WTFb zeigen keine nennenswerte Modulation des CD46-Proteins.

4.4 IFN-Effekte bei MV

Typ I- und Typ II-Interferone spielen aufgrund ihrer vielfältigen biologischen Aktivität eine große Rolle in der viralen Abwehr des Immunsystems (Malmgaard, 2004).

4.4.1 Wirkung von IFN auf MV-Impfstämme in EZ

Die Replikation der MV-Impfstämme wird durch die Typ I-Interferone gehemmt (Wu & Shiro, 1984; Crespi *et al.*, 1986). Nach einer akuten MV-Infektion und nach einer MV-Impfung ist die Konzentration des Typ II-Interferons (IFN- γ) im Serum erhöht (Okada *et al.*, 2001; Ovsyannikova *et al.*, 2003). Deswegen wurde untersucht, ob IFN- γ auch die MV-Replikation *in vitro* hemmen kann.

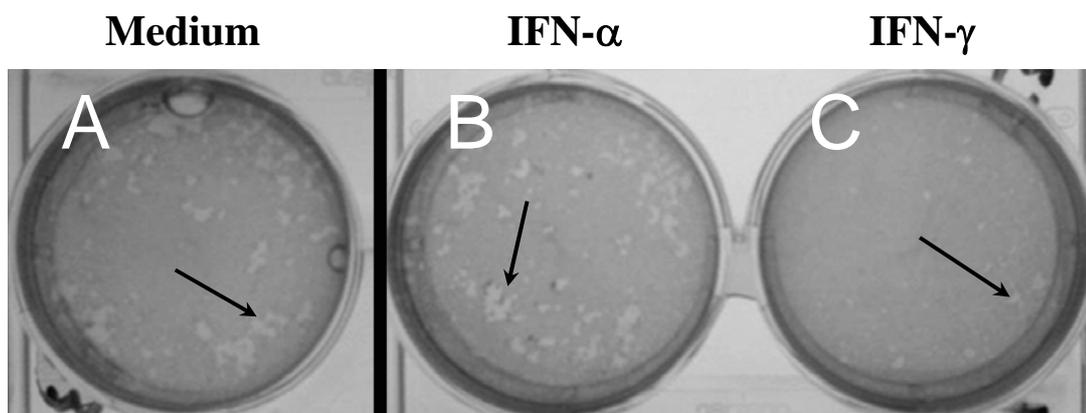


Abbildung 4.8: Wirkung von IFN- α und IFN- γ auf die MV-Replikation.

HBMECs wurden mit MV-Edm (MOI =1) infiziert und mit Medium (A), IFN- α (100 U/ml; B) und IFN- γ (100 U/ml; C) behandelt. Nach 4 Tagen wurde die Anzahl der Plaques (siehe Pfeile) mit einer Neutralrotfärbung ermittelt.

Die Verwendung der Neutralrotfärbung in der Zellkultur zeigt an, ob die Zellen intakte Lysosomen besitzen. Uninfizierte lebende Zellen nehmen den roten Farbstoff auf. Infizierte Zellen dagegen bleiben ungefärbt und erscheinen optisch als Plaque (Laude *et al.*, 1978). In der Abbildung 4.8 erkennt man zahlreiche Plaques bei den unbehandelten

EZ. Die Anzahl und die Größe der Plaques sind für die quantitative Auswertung entscheidend. Diese nehmen bei der IFN- α -Stimulation der MV-infizierten EZ ab. Werden MV-infizierte EZ mit IFN- γ inkubiert, nimmt die Plaquebildung auch deutlich ab.

4.4.2 Wirkung von IFN auf MV-Wildtypstämme in EZ

Typ I-Interferone zeigen eine antivirale Wirkung gegenüber attenuierten MV-Stämmen. MV-Wildtypisolate hingegen haben die Fähigkeit dieser entgegenzuwirken, indem sie sowohl die Induktion von Interferon unterdrücken als auch die induzierten intrazellulären Vorgänge blockieren können (Naniche *et al.*, 2000). In der Abbildung 4.8 konnte gezeigt werden, dass sowohl IFN- α als auch IFN- γ die Plaquebildung von MV-Impfstämmen hemmen können. Deshalb stellte sich die Frage, ob IFN- α als auch IFN- γ die Vermehrung von Wildtyp-MV hemmen können. Die Immunfluoreszenzbilder in der Abbildung 4.9 auf der nächsten Seite zeigen, dass sowohl der MV-Impfstamm Edm als auch der Wildtypstamm Wü4797 sich in den mikrovaskulären Gehirnendothelzellen (HBMECs) ohne Zusätze vermehren können (A und D). Obwohl diese Zellen nur CD46 als Masernrezeptor auf der Oberfläche exprimieren, kann man MV N-Proteine von Wildtyp-MV mittels der Immunfluoreszenz-Methode detektieren (Andres *et al.*, 2003). Behandelt man HBMECs, die mit MV-Edm infiziert sind, mit IFN- α sieht man eine deutliche Abnahme der Virusausbreitung (B). Aber die Syncytienbildung des Wildtyp-MV Wü4797 scheint in Anwesenheit von IFN- α nicht gehemmt zu werden (E). Im Gegensatz dazu zeigt eine Behandlung der EZ mit IFN- γ eine deutliche Reduktion der Synzytienbildung der MV-Stämme (C und F). Am deutlichsten erkennt man die antivirale Wirkung von IFN- γ sowohl bei MV-Impfstamm als auch MV-Wildtypstamm in den Ausschnitten der Bilder C und F.

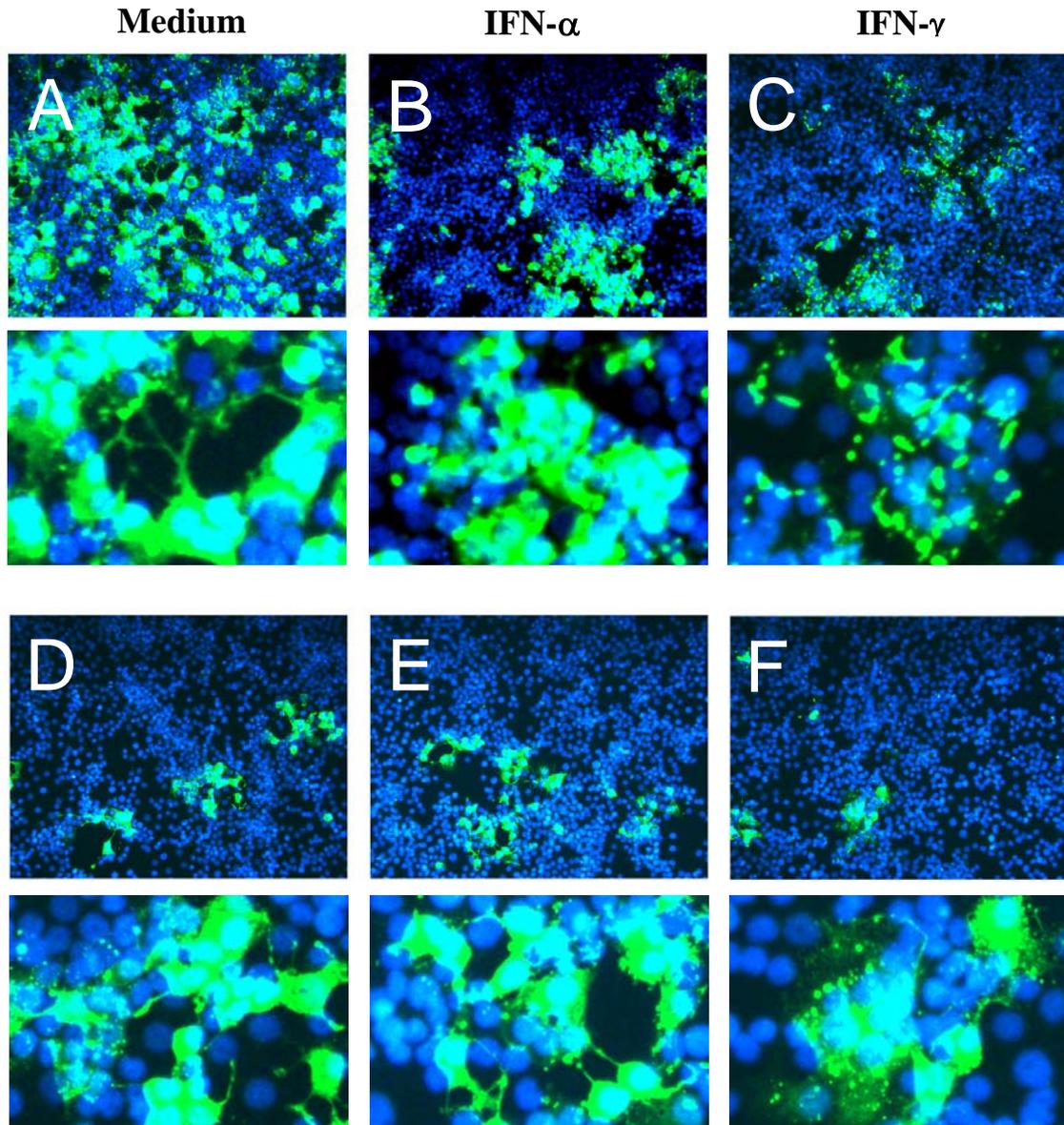


Abbildung 4.9: Detektion der Wirkung von IFN auf die MV-Ausbreitung in EZ mittels der Immunfluoreszenz-Methode.

HBMECs wurden mit dem Impfstamm MV-Edm (A-C) und mit dem MV-Wildtypstamm Wü4797 (D-F) mit einer MOI = 0,1 in Ab- und Anwesenheit von IFN- α (500 U/ml) und IFN- γ (500 U/ml) infiziert. Infizierte HBMECs wurden nach 48 Stunden fixiert und anschließend permeabilisiert. Die viralen N-Proteine wurden mit dem monoklonalen Erst-Ak (F227) und mit dem Alexa Fluor 488-konjugierten Sekundär-Ak gefärbt (grüne Färbung). Zellkerne zeigen eine blaue Färbung (DAPI). Die Ausschnitte stellen eine fünffache Vergrößerung dar.

4.4.3 Wirkung von IFN bei infizierten B-Lymphozyten

Es wurde die Wirkung von IFN auf die humane B-Zelllinie BJAB getestet. Die Abbildung 4.10 zeigt, dass die Behandlung der humanen B-Zelllinie (BJAB) mit Interferonen (IFN- α und IFN- γ ; je 500 U/ml) den Phänotyp der Zellen nicht verändert (A-C). Infiziert man diese CD46/CD150-positiven B-Lymphozyten mit MV, so sieht man eine deutliche Synzytienbildung (D und G). Werden diese Zellen jedoch in Anwesenheit von IFN- α mit dem MV-Impfstamm Edm infiziert, wird die Synzytienbildung deutlich gehemmt (E). Hingegen hemmt IFN- α nicht die Bildung von Synzytien bei dem MV-Wildtypstamm Wü4797 (H). Das Typ II-Interferon zeigt keine Wirkung auf die Virusausbreitung und auf die Synzytienbildung bei Impf- und Wildtyp-MV (F und I).

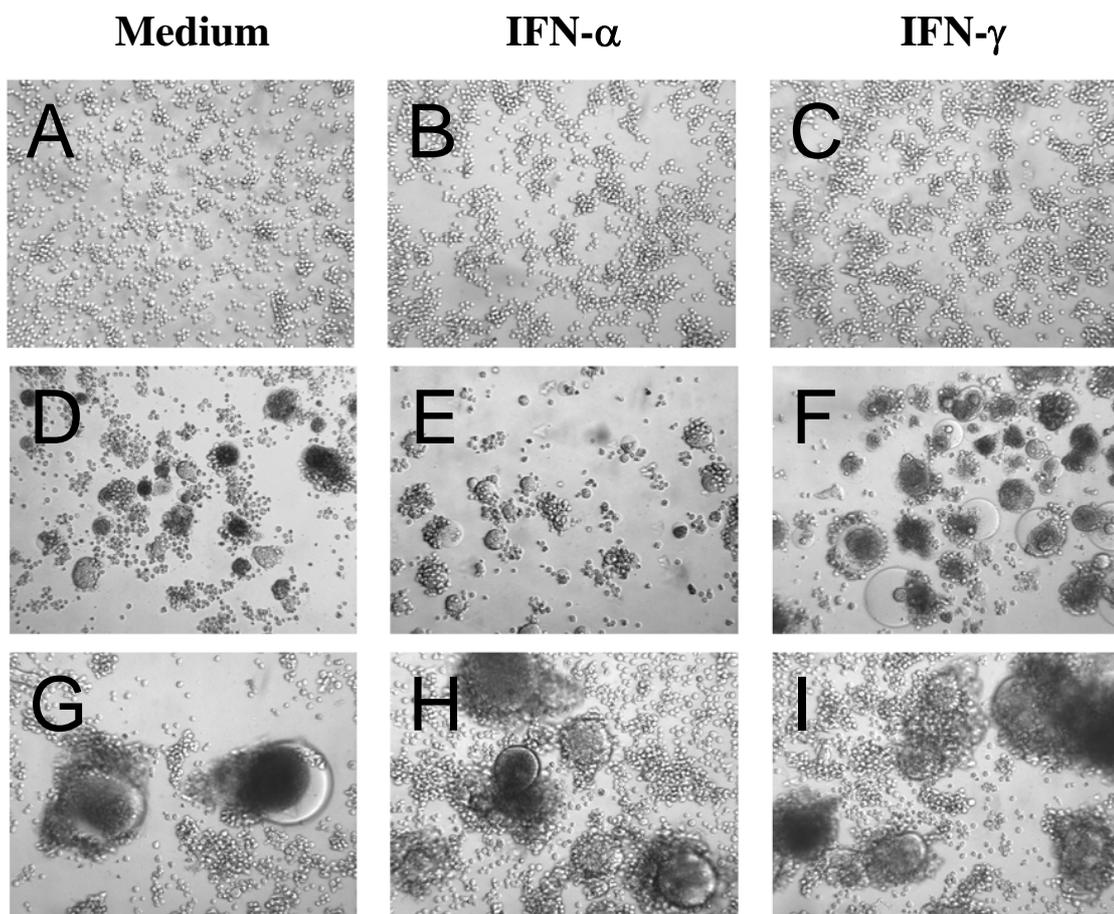


Abbildung 4.10: Detektion der MV-Ausbreitung in der humanen B-Zelllinie (BJAB) anhand von Phasenkontrastbildern.

BJAB wurden mit dem Impfstamm MV-Edm (D-F) und mit dem Wildtypstamm Wü4797 (G-I) mit einer MOI = 0,1 in Abwesenheit und Anwesenheit von IFN- α (500 U/ml) und IFN- γ (500 U/ml) infiziert. Die uninfizierten Zellen mit entsprechender Behandlung sind in A-C dargestellt.

4.4.4 Wirkung von IFN auf die MV-Titer

In den Punkten 4.4.2 und 4.4.3 wurde mittels Immunfluoreszenz-Methode und Phasenkontrastbildern der unterschiedliche antivirale Effekt von IFN- α und IFN- γ sowohl in HBMECs als auch in BJAB-Zellen gezeigt. Diese Methoden ergaben eine qualitative Aussage. Um nun quantitativ relevante Messwerte zu erhalten, wurden HBMECs und BJAB-Zellen mit MV (Edm, Wü4797) infiziert und nach 3 Tagen Postinfektion wurden die Virustiter ermittelt.

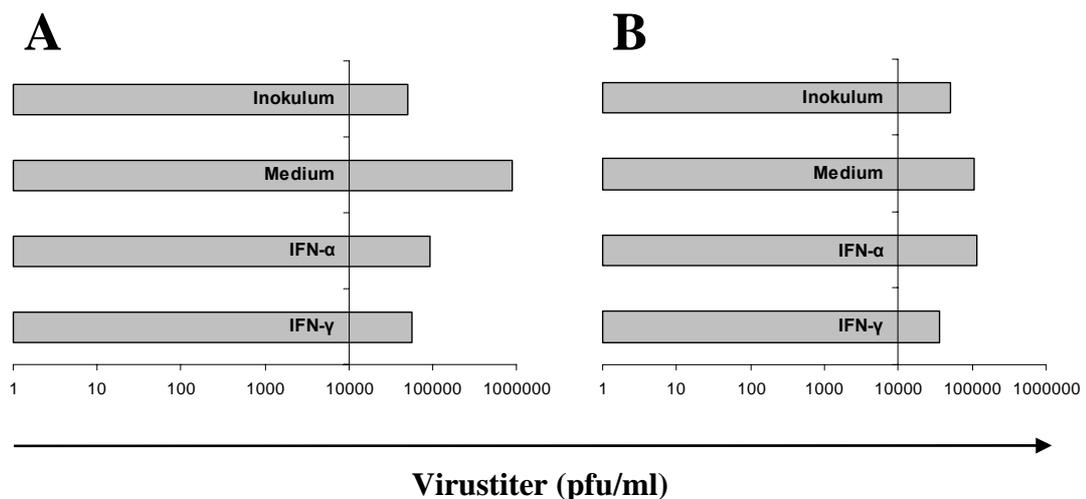


Abbildung 4.11: Effekt von IFN- α und IFN- γ auf die Replikation von MV-Edm (A) und MV-Wü4797 (B) in HBMECs.

HBMECs wurden mit dem MV-Edm (A) oder mit dem MV-Wü4797 (B) mit einer MOI = 0,1 in Ab- und Anwesenheit von IFN- α (500 U/ml) und IFN- γ (500 U/ml) infiziert. Nach 3 Tagen wurde die Menge an neu gebildeten Viren (zellgebundenes und zellfreies Virus zusammen) anhand eines Plaquetests ermittelt. Als Inokulum wurden 5×10^4 pfu/ml je Virus verwendet (N=3, $P < 0,001$).

Die absoluten Werte für die Titration des MV-Edm in HBMECs waren $9,0 \times 10^5 \pm 1,4 \times 10^5$ in unbehandelten Zellen, $9,2 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$ in der Anwesenheit von IFN- α und $5,7 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$ in Anwesenheit von IFN- γ . Die absoluten Werte für die Titration des MV-Wü4797 in HBMECs waren hingegen $1,2 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$ in unbehandelten Zellen, $1,1 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$ in der Anwesenheit von IFN- α und $3,6 \times 10^4 \pm 0,6 \times 10^4$ in Anwesenheit von IFN- γ . Aus diesen Werten kann man ablesen, dass die Replikation des MV-Edm sowohl durch IFN- α als auch durch IFN- γ deutlich gehemmt wird. Die Replikation des MV-Wü4797 wird nur durch IFN- γ inhibiert.

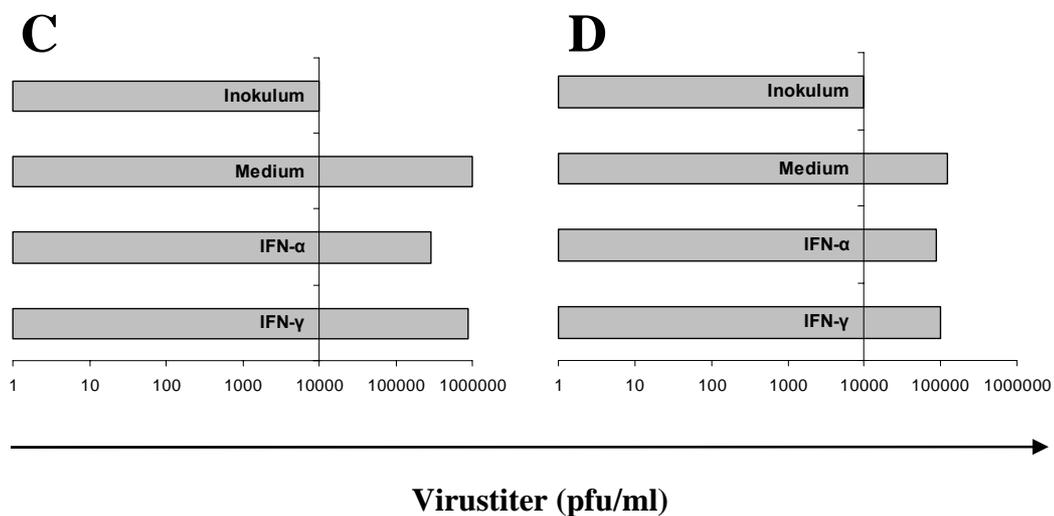


Abbildung 4.12: Effekt von IFN- α und IFN- γ auf die Replikation von MV-Edm (C) und MV-Wü4797 (D) in BJAB-Zellen.

BJAB-Zellen wurden mit dem MV-Edm (A) oder mit dem MV-Wü4797 (B) mit einer MOI = 0,1 in Ab- und Anwesenheit von IFN- α (500 U/ml) und IFN- γ (500 U/ml) infiziert. Nach 3 Tagen wurde die Menge an neu gebildeten Viren (zellgebundenes und zellfreies Virus zusammen) anhand eines Plaquetests ermittelt. Als Inokulum wurden 10^4 pfu/ml je Virus verwendet (N=3, $P < 0,001$).

Die absoluten Werte für die Titration des MV-Edm in BJAB-Zellen waren $9,9 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$ in unbehandelten Zellen, $2,9 \times 10^5 \pm 1,9 \times 10^5$ in der Anwesenheit von IFN- α und $8,7 \times 10^5 \pm 0,3 \times 10^5$ in Anwesenheit von IFN- γ . Die absoluten Werte für die

Titration des MV-Wü4797 in HBMECs waren hingegen $1,3 \times 10^5 \pm 0,1 \times 10^5$ in unbehandelten Zellen, $8,7 \times 10^4 \pm 0,4 \times 10^4$ in der Anwesenheit von IFN- α und $9,7 \times 10^4 \pm 1,1 \times 10^4$ in Anwesenheit von IFN- γ . Aus diesen Werten kann man ablesen, dass nur IFN- α die Titer von MV-Edm in BJAB-Zellen reduziert.

4.4.5 Antivirale Wirkung von IFN

Die antivirale Wirkung von Interferonen wurde in verschiedenen Zellen analysiert. Es wurde die Lungen-Epithelzelllinie A549, die humanen primären EZ aus der Nabelschnurvene (HUVECs), die mikrovaskuläre Gehirn-Endothelzelllinie (HBMEC) und die Neuroblastoma-Zelllinie IMR-32 verwendet. Diese Zellen wurden mit MV-Edm in Ab- und Anwesenheit von IFN- α und IFN- γ infiziert und neu gebildete MV anhand eines Plaque-Assays ermittelt.

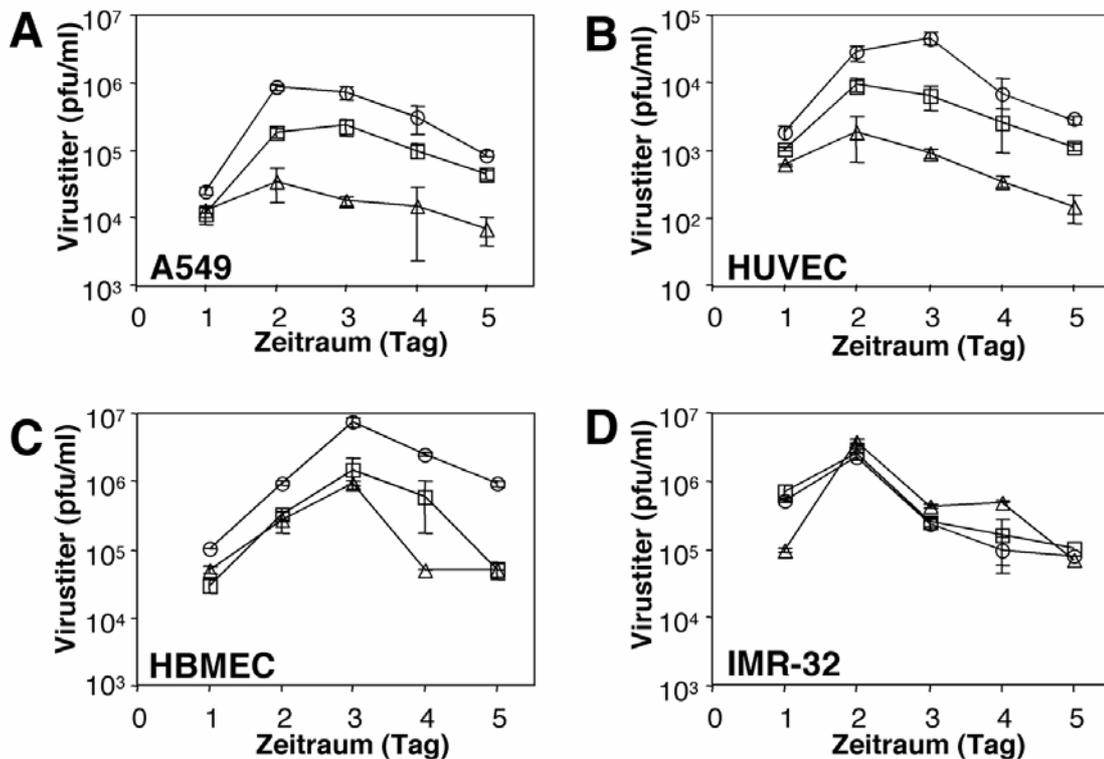


Abbildung 4.13: Effekt von IFN- α und IFN- γ auf die MV-Replikation in unterschiedlichen Zelltypen mittels eines Plaque-Assays.

Die Lungen-Epithelzelllinie A549 (A), die humanen primären EZ aus der Nabelschnurvene, HUVECs (B), die Gehirndothelzelllinie, HBMECs (C) und die Neuroblastoma-Zelllinie IMR-32 (D) wurden mit dem MV-Edm mit einer MOI = 1 in Ab- und Anwesenheit von IFN- α (100 U/ml) und IFN- γ (100 U/ml) infiziert. Nach 1 bis 5 Tagen wurde die Menge an neu gebildeten Viren (zellgebundenes und zellfreies Virus zusammen) anhand eines Plaquetests ermittelt. Der Verlauf der Virustiter der Mediumkontrolle (offene Kreise), der IFN- α - behandelten (offene Quadrate) und der IFN- γ -behandelten (offene Dreiecke) Zellen sind dargestellt. Die Inhibition der Virusreplikation durch IFN- γ ist statistisch gesehen hoch signifikant mit $P < 0,001$ (B,C) und $P < 0,005$ (D).

Wie man in der Abbildung 4.13 erkennen kann, hat weder IFN- α noch IFN- γ in der Neuroblastoma-Zelllinie IMR-32 irgendeinen Einfluss auf die MV-Replikation (D). Hingegen induzieren sowohl IFN- α als auch IFN- γ in der Lungen-Epithelzelllinie A549 (A), in der Gehirn-Endothelzelllinie (HBMEC) (C) und in den primären EZ aus der Nabelschnurvene den HUVECs (D) einen antiviralen Effekt. Speziell in den A549-Zellen und HUVECs zeigt IFN- γ einen starken inhibitorischen Effekt, indem die Virustiter bis 100 fach reduziert werden. In den HBMECs wurde die MV-Replikation bis zu 1 log-Stufe verringert.

4.4.6 Vorbehandlung mit IFN

Um die Zeitdauer der Induktion des antiviralen Effekts zu analysieren, wurden die Zellen 24 Stunden vor der Infektion mit IFN behandelt. Zusätzlich als Kontrolle wurden die Zellen noch mit dem Tumornekrosefaktor (TNF)- α (100 U/ml) vor der Infektion inkubiert.

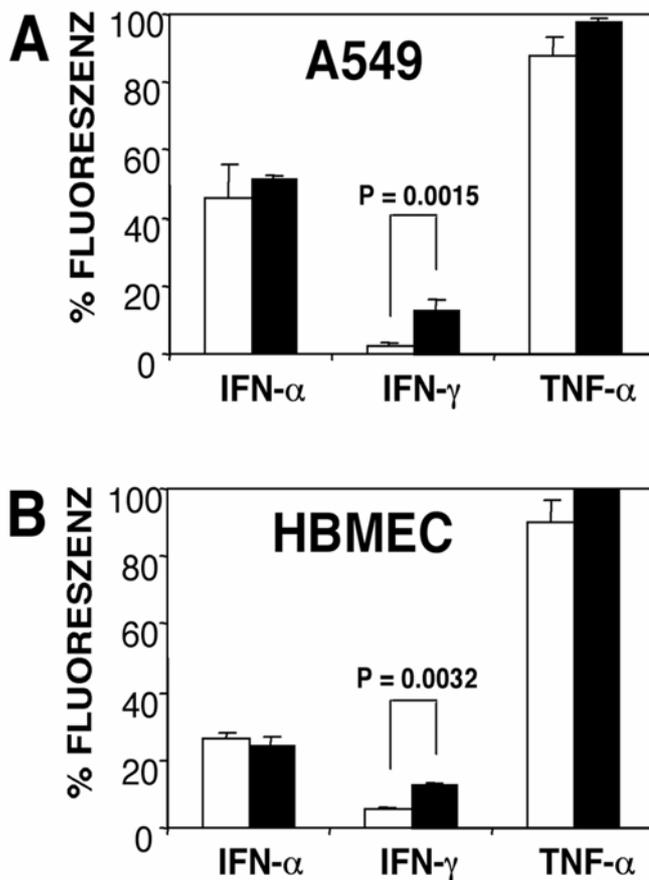


Abbildung 4.14: Effekt der IFN- γ -Vorbehandlung.

A549-Zellen und HBMECs wurden einerseits 24 Stunden vor der Infektion (weiße Balken) und andererseits während der Infektionsdauer (schwarze Balken) mit je 100 U/ml IFN- α , IFN- γ und TNF- α (als Kontrolle) behandelt. Die Infektion erfolgte mit dem GFP-markierten MV-Stamm (EdmGFP) mit einer MOI = 1. Die Autofluoreszenz der infizierten Kulturen wurde mit einem Fluoreszenz-Reader (Labsystems) 48 Stunden Postinfektion gemessen. Die Werte wurden der Fluoreszenz des Kontrollmediums entsprechend auf 100% gesetzt.

In der Abbildung 4.14 ist die Vorbehandlung der Zellen (A549 und HBMECs) mit IFN- α , IFN- γ und TNF- α dargestellt. IFN- α als Typ I-Interferon senkt die MV-Ausbreitung in A549-Zellen auf ca. 50 % und in HBMECs auf 30 %, also um 70-75 %. Werden die Zellen 24 Stunden vor der Infektion mit IFN- γ behandelt, hemmt dieses Typ II-Interferon die MV-Replikation auf ca. 5 %, also um 95 %. Gibt man IFN- γ nur während der Infektionsdauer dazu, erhält man eine Verminderung der MV-Ausbreitung auf ca.

10 %. TNF- α hingegen induziert keinen nennenswerten antiviralen Effekt, weder 24 Stunden vor der Infektion noch während der Infektionsdauer.

4.4.7 Wirkung von IFN- γ auf das Zellwachstum

Es wurde untersucht, ob IFN- γ eine Rolle bei der Proliferation der Zellen spielt. Deswegen wurden die Lungen-Epithelzelllinie A549 (A) und die Neuroblastoma-Zelllinie IMR-32 (B) mit verschiedenen Konzentrationen (0-1000 U/ml) an IFN- γ für 3 Tage behandelt. Jeden Tag wurden die vitalen Zellen gezählt.

Wie man in Abbildung 4.15 erkennen kann, hat die Behandlung der Zellen mit IFN- γ keinen Einfluss auf die Neuroblastoma-Zelllinie IMR-32 (B). Hingegen induziert die IFN- γ -Behandlung in der Lungen-Epithelzelllinie A549 eine Verzögerung der Proliferation. Die Wachstumsrate der Zellen verzögert sich ab den zweiten Tag der Behandlung.

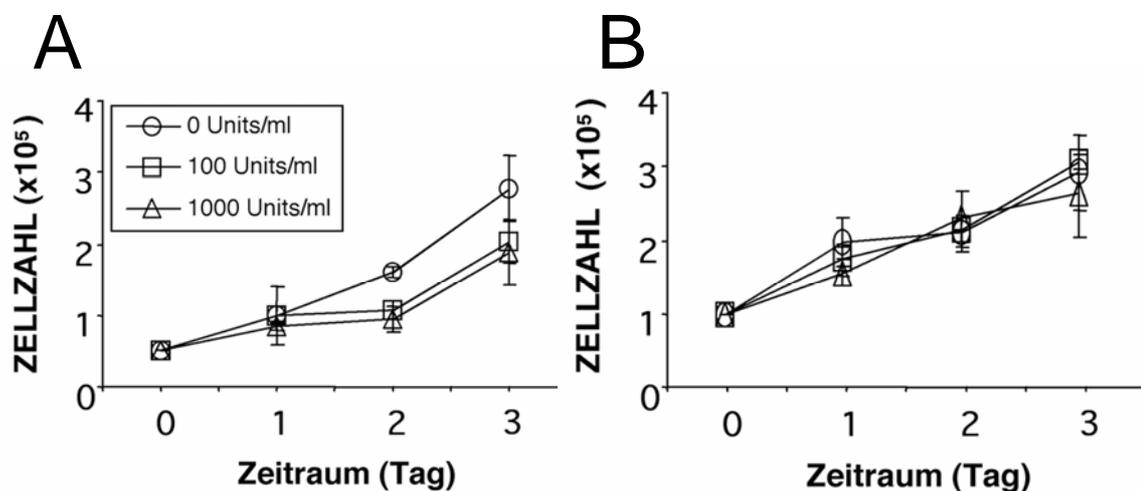


Abbildung 4.15: Effekt von IFN- γ auf das Zellwachstum.

A549-Zellen (A) und IMR-32-Zellen (B) wurden mit 0, 100 und 1000 U/ml IFN- γ behandelt und die Zellzahl wurde täglich bestimmt.

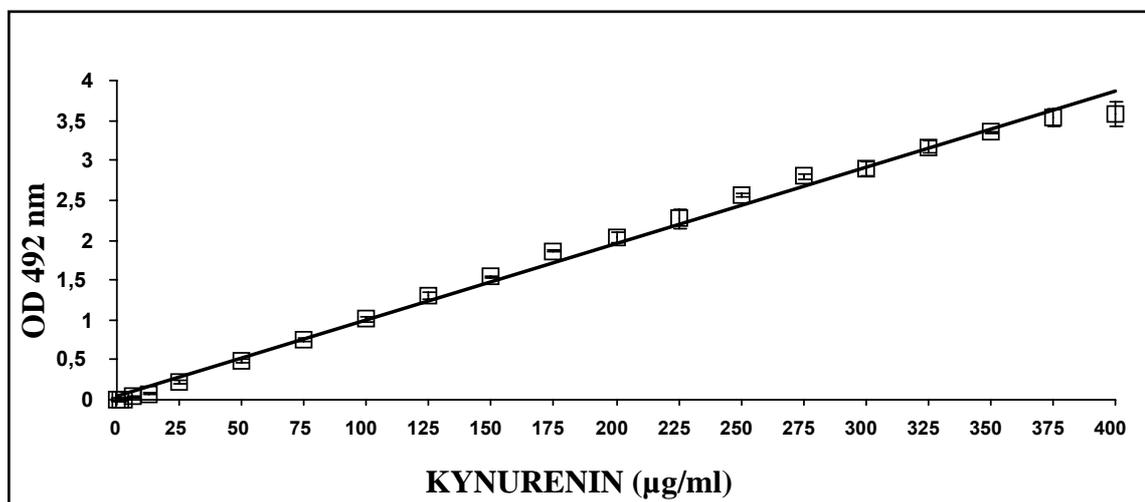
4.5 Induktion der IDO

Im Jahre 1988 legten Takikawa *et al.* und Ozaki *et al.* dar, dass das Enzym Indolamine 2,3-Dioxygenase (IDO) durch IFN- γ intrazellulär induziert werden kann. In den folgenden Experimenten konnte erstmals gezeigt werden, dass diese Induktion in humanen Epi- und Endothelzellen durch IL-1 verstärkt werden kann.

4.5.1 Erstellen einer Kynurenin-Standardkurve

Anhand einer Kynurenin-Standardkurve kann die IDO-Induktion quantitativ ermittelt werden. Dafür wird Kynurenin in Konzentrationen von 0 bis 400 $\mu\text{g/ml}$ im Medium (IMDM + 5% FKS) verdünnt. Entsprechend nach der Methode von Däubener *et al.* wird die Optische Dichte bei 492 nm in einem Photometer ELISA Reader bestimmt (Däubener *et al.*, 1994).

Abbildung 4.16: Kynurenin-Standardkurve.



Die Abbildung 4.16 zeigt die Kynurenin-Standardkurve. Die Werte der Optischen Dichte wurden auf der Y-Achse und die Konzentrationsverdünnungen auf der X-Achse aufgetragen. Anschließend wurde eine lineare Trendlinie eingefügt. Dadurch können die

entsprechenden Konzentrationen abgelesen werden. Als Beispiel entspricht ein OD-Wert von 1,5 der Kynureninkonzentration von 150 $\mu\text{g/ml}$ im Zellüberstand.

4.5.2 Superinduktion mit IL-1 β

IDO kann intrazellulär durch IFN- γ in bestimmten Zellen induziert werden. Erstmals konnte gezeigt werden, dass diese Induktion mit dem Zytokin IL-1 β verstärkt werden kann.

Wie man aus der Abbildung 4.17 erkennen kann, wird IDO in der Lungen-Epithelzelllinie A549 induziert. Werden diese Zellen mit einer Konzentration von 250 U/ml an IFN- γ stimuliert, kann man ca. 50 $\mu\text{g/ml}$ Kynurenin im Zellüberstand messen. Bei höheren Konzentrationen an IFN- γ erreicht der Kynureninanteil eine Plateauphase. Werden diese Zellen aber zusätzlich noch mit IL-1 β (100 U/ml) versetzt, kann man Kynureninkonzentrationen von bis zu 150 $\mu\text{g/ml}$ messen. Bei der mikrovaskulären Endothelzelllinie HBMEC erhält man bei der am höchsten eingesetzten Konzentration an IFN- γ eine Kynureninanteil von ca. 50 $\mu\text{g/ml}$. Erfolgt eine zusätzliche IL-1 β Behandlung, wird eine Kynureninkonzentration von ca. 120 $\mu\text{g/ml}$ erreicht. Die humane B-Zelllinie BJAB und die Neuroblastoma-Zelllinie IMR-32 zeigen hingegen weder in Ab- noch in Anwesenheit von IL-1 β eine IDO-Induktion.

Abbildung 4.17: Zelltypspezifische IDO-Induktion.

A549- (A), HBMECs (B), BJAB- (C) und IMR-32- (C) Zellen wurden mit einer ansteigenden Konzentration an IFN- γ (0-1000 U/ml) ohne und mit IL-1 β behandelt. Die spezifische IDO-abhängige Bildung an N-Formyl-Kynurenin wurde anhand der Quantifizierung von Kynurenin im Zellüberstand ermittelt. Die Kynurenin Synthese wurde nach 3 Tagen bestimmt und anhand des Kynureninstandards in die Einheit $\mu\text{g/ml}$ umgerechnet. Zusätzlich wurden die Zellen mit IL-1 β (100 U/ml) inkubiert. Die dreifachen Werte entsprechen 3 unabhängigen Experimenten (N=3).

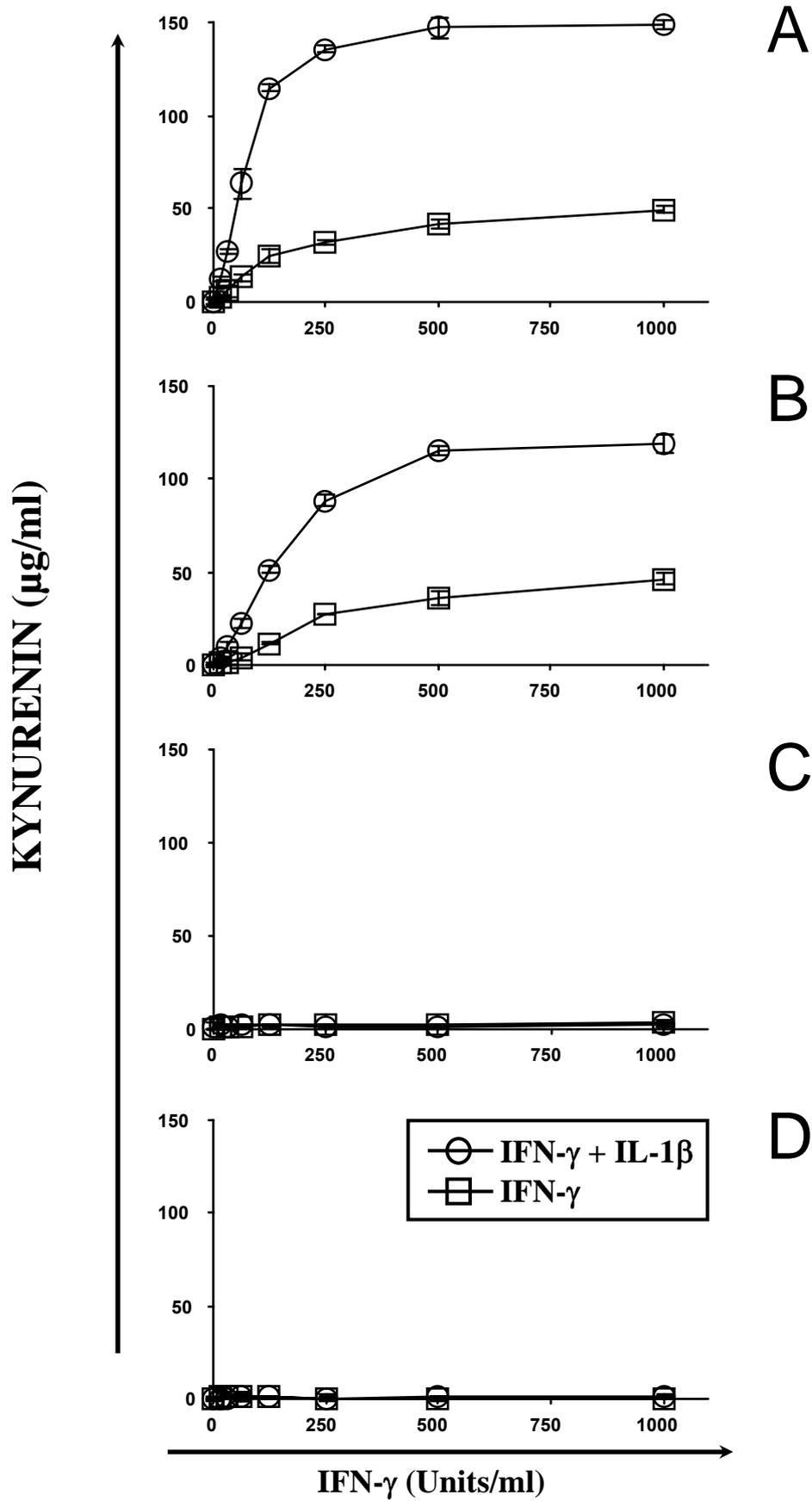


Abbildung 4.17: Zelltypspezifische IDO-Induktion.

4.5.3 Nachweis und Steigerung der IDO-Aktivität

Die Replikation des Herpes Simplex Virus Typ 2 (HSV-2) wird in den Cervixcarcinoma- und in den Astrozytoma-Zellen durch IFN- γ gehemmt. Dieser antivirale Effekt wird durch die Anwesenheit des Tumornekrosefaktors TNF- α verstärkt (Adams *et al.*, 2004b). Daher hat sich die Frage gestellt, ob IDO auch durch das Zytokin TNF- α induziert werden kann. Jenes wird als inaktives Vorläuferprotein synthetisiert und durch die Metallo-proteinasen TACE (TNF- α *converting enzyme*) oder ADAM10 (*a disintegrin and metalloproteinase*) gespalten (Moss *et al.*, 1997; Rosendahl *et al.*, 1997; Black, 2002). Die Effekte des TNF sind sehr breitgefächert und reichen von immunregulatorischen, inflammatorischen bis zu pathophysiologischen Wirkungen und werden nach Bindung an spezifische TNF-Rezeptoren ausgelöst. Daneben ist zu erwähnen, dass das Zytokin TNF gemeinsam mit IL-1 α und IL-1 β sowie IFN- γ ein zentraler Mediator der nicht-adaptiven Immunantwort ist.

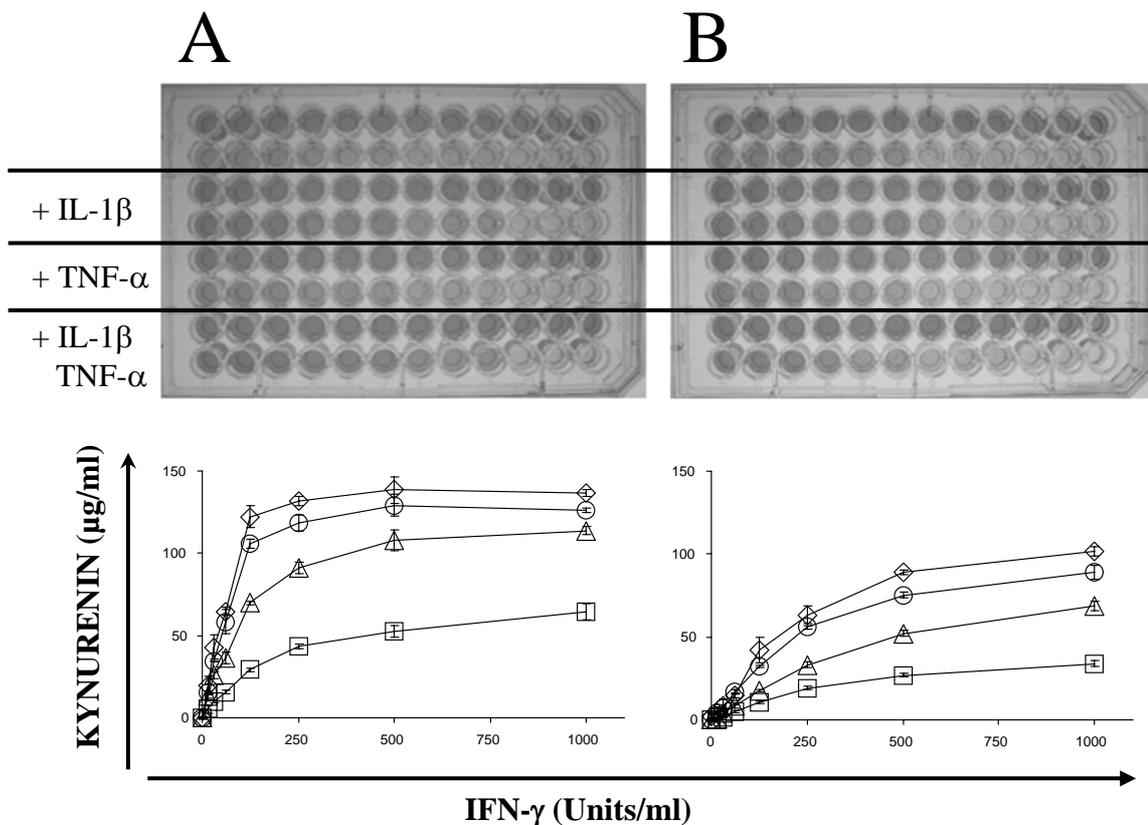


Abbildung 4.18: Messung der IDO-Aktivität
in A549-Zellen (A) und HBMECs (B).

A549-Zellen (A) und HBMECs (B) wurden mit einer ansteigenden Konzentration an IFN- γ (0-1000 U/ml) behandelt. Zusätzlich wurde noch IL-1 β (100 U/ml; offene Kreise) oder TNF- α (100 U/ml; offene Dreiecke) oder beides in Kombination (offene Rauten) hinzu gegeben. Die spezifische IDO-abhängige Bildung an N-Formyl-Kynurenin wurde anhand der Quantifizierung von Kynurenin im Zellüberstand ermittelt. Die Kynureninsynthese wurde nach 3 Tagen bestimmt und anhand des Kynureninstandards in die Einheit $\mu\text{g/ml}$ umgerechnet. Die dreifachen Werte entsprechen 3 unabhängigen Experimenten (N=3).

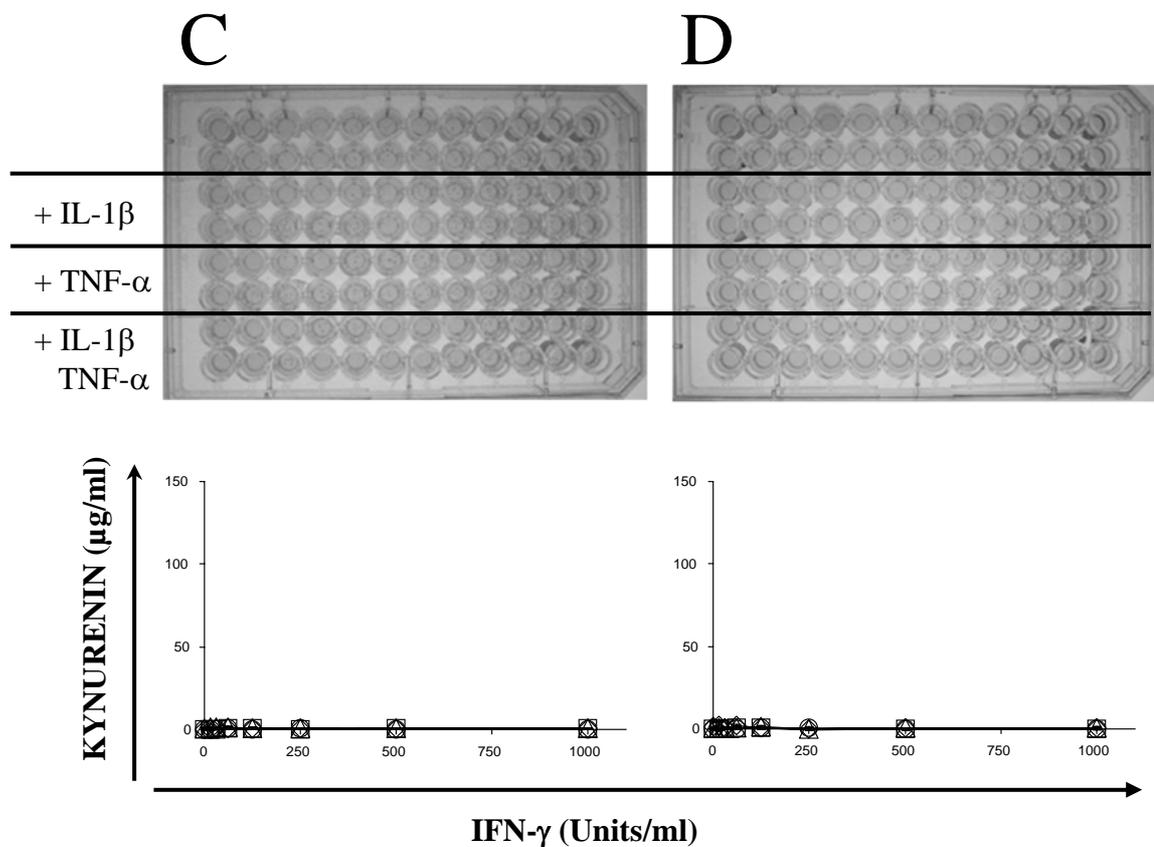


Abbildung 4.19: Messung der IDO-Aktivität in IMR-32-Zellen (C) und NT2-Zellen (D).

IMR-32 Zellen (C) und NT2-Zellen (D) wurden mit einer ansteigenden Konzentration an IFN- γ (0-1000 U/ml) behandelt. Zusätzlich wurde noch IL-1 β (100 U/ml; offene Kreise) oder TNF- α (100 U/ml; offene Dreiecke) oder beides in Kombination (offene Rauten) hinzu gegeben. Die spezifische IDO-abhängige Bildung an N-Formyl-Kynurenin wurde anhand der Quantifizierung von Kynurenin im Zellüberstand ermittelt. Die Kynureninsynthese wurde nach 3 Tagen

bestimmt und anhand des Kynureninstandards in die Einheit $\mu\text{g/ml}$ umgerechnet. Die dreifachen Werte entsprechen 3 unabhängigen Experimenten ($N=3$).

Wie man in der Abbildung 4.18 erkennen kann, lässt sich die IDO-Aktivität sowohl in Epithelzellen (A) als auch in Endothelzellen (B) durch die Stimulation mit IL-1 β oder TNF- α oder in Kombination steigern. Hingegen lässt in Abbildung 4.19 deutlich erkennen, dass in den IMR-32 Zellen und in den NT2-Zellen keine IDO-Aktivität vorhanden ist. Diese lässt sich weder durch Stimulation mit dem IL-1 β noch mit TNF- α oder in Kombination induzieren.

Zusätzlich wurden noch weitere Zelllinien auf ihre IDO-Induktion nach IFN- γ Behandlung getestet. Die humane Epithelzelllinie ARPE19 (Rakoczy *et al.*, 1998) zeigte bei 1000 U/ml IFN- γ eine Kynureninkonzentration im Überstand von ungefähr 50 $\mu\text{g/ml}$. Wenn man die Zellen unter diesen Bedingungen noch zusätzlich mit 100 U/ml TNF- α oder in Kombination mit TNF- α und IL-1 β (je 100 U/ml) stimulierte stieg die Kynureninkonzentration auf 100 $\mu\text{g/ml}$ an. Vero-, HeLA-, THP-1-Zellen zeigten ebenfalls eine IDO-Aktivität auf, jedoch lagen die Kynureninkonzentrationen bei einer Stimulation von 1000 U/ml IFN- γ unter 50 $\mu\text{g/ml}$. Die T-Zelllinie Jurkat und die mit MV persistent infizierte B-Zelllinie (BJAB pEdm) zeigten keine IFN- γ -induzierte IDO-Aktivität.

4.6 IDO im Zuge einer MV-Infektion

4.6.1 Nachweis der IDO mRNA

Da die MV-Infektion allein weder im biochemischen Assay noch auf Proteinebene die IDO-Aktivität bzw. das Protein selbst induzieren konnte, stellt sich die Frage, ob man IDO als Transkript im Zuge einer Maserninfektion nachweisen kann. Dazu wurden A549-Zellen mit MV Edm (MOI = 0,1) in Ab- und Anwesenheit von IFN- γ in ansteigenden Konzentrationen infiziert, die Gesamt-RNA nach 3 Tagen Postinfektion isoliert und eine RT-PCR durchgeführt.

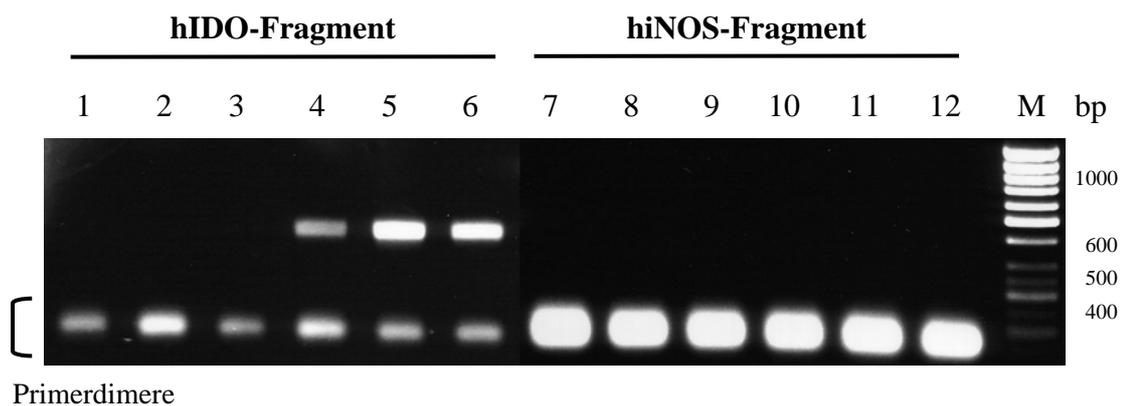


Abbildung 4.20: Humane IDO- und humane iNOS-spezifische mRNA Expression.

Mittels RT-PCR wurde von A549-Zellen (Gelspuren 1, 7), MV-infizierten A549-Zellen (Gelspuren 2, 8), MV-infizierten, mit 100 U/ml IFN- γ , A549-Zellen (Gelspuren 3, 9), MV-infizierten, mit 250 U/ml IFN- γ , A549-Zellen (Gelspuren 4, 10), MV-infizierten, mit 500 U/ml IFN- γ , A549-Zellen (Gelspuren 5, 11), MV-infizierten, mit 1000 U/ml IFN- γ , A549-Zellen (Gelspuren 6, 12) ein 463 bp großes IDO-Fragment (Gelspuren 1-6) und ein 778 bp großes iNOS-Fragment (Gelspuren 7-12) amplifiziert.

Wie man in Abbildung 4.20 erkennen kann, wird IDO in den A549-Zellen nicht konstitutiv als Transkript exprimiert. Weder die MV-Infektion noch die zusätzliche Behandlung mit 100 U/ml IFN- γ führt zu einer Induktion der IDO-mRNA. Erst dann, wenn infizierte A549-Zellen mit einer Konzentration von 250 U/ml an IFN- γ stimuliert werden, detektiert man eine IDO mRNA-Expression, die sich mit zunehmender Konzentration an IFN- γ verstärkt. Hingegen kommt es in den A549-Zellen zu keiner iNOS mRNA-Expression. Auch eine MV-Infektion und eine zusätzliche Behandlung mit IFN- γ führt zu keiner iNOS-Induktion.

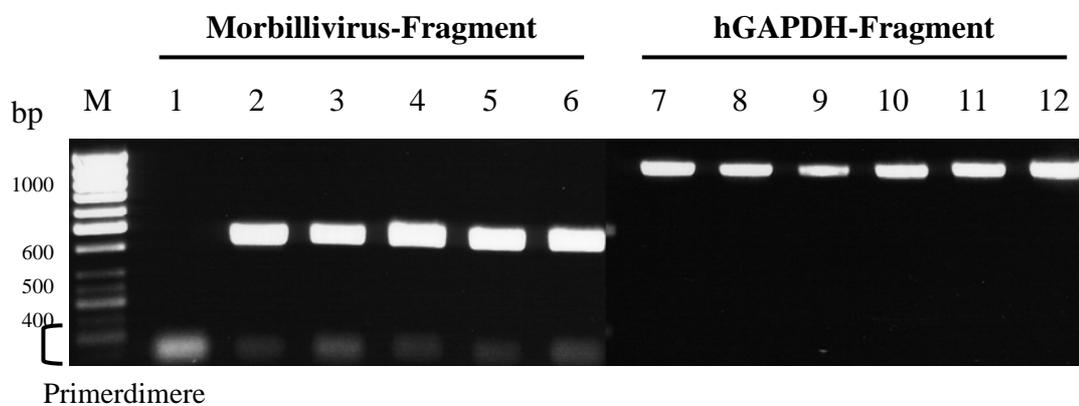


Abbildung 4.21: Morbilliviren- und humane GAPDH-spezifische mRNA Expression.

Mittels RT-PCR wurde von A549-Zellen (Gelspuren 1, 7), MV-infizierten A549-Zellen (Gelspuren 2, 8), MV-infizierten, mit 100 U/ml IFN- γ , A549-Zellen (Gelspuren 3, 9), MV-infizierten, mit 250 U/ml IFN- γ , A549-Zellen (Gelspuren 4, 10), MV-infizierten, mit 500 U/ml IFN- γ , A549-Zellen (Gelspuren 5, 11), MV-infizierten, mit 1000 IFN- γ , A549-Zellen (Gelspuren 6, 12) ein 429 bp großes Morbillivirus-spezifisches Fragment (Gelspuren 1-6) und ein GAPDH-Fragment (Gelspuren 7-12) als Kontrolle amplifiziert.

Die Abbildung 4.21 dient als Kontrolle zur Abbildung 4.20. Die Gelspur 1 weist keine Bande auf. Dies gilt als Beweis, dass die A549-Zellen nicht infiziert waren. Die Gelspuren 2 bis 6 zeigen jeweils eine Bande bei 429 bp. Dabei handelt es sich um ein Fragment, das mit universellen Primer für Morbilliviren amplifiziert werden konnte. Die GAPDH-Banden in den Gelspuren 7 bis 12 entsprechen der RT-PCR Kontrolle.

4.6.2 Nachweis der IDO-Aktivität

IDO kann durch IFN- γ induziert werden. Diese Induktion kann durch IL-1 β verstärkt werden. Nun stellt sich die Frage ob die Infektion der Zellen mit MV allein IDO induziert oder in Kombination mit IFN- γ . Die Lungen-Epithelzelllinie A549 und die Gehirn-Endothelzelllinie (HBMEC) wurden mit entsprechenden Konzentrationen an IFN- γ 3 Tage lang stimuliert, dann erfolgte die Virusinfektion und nach weiteren 3 Tagen wurde die Kynureninkonzentration ermittelt.

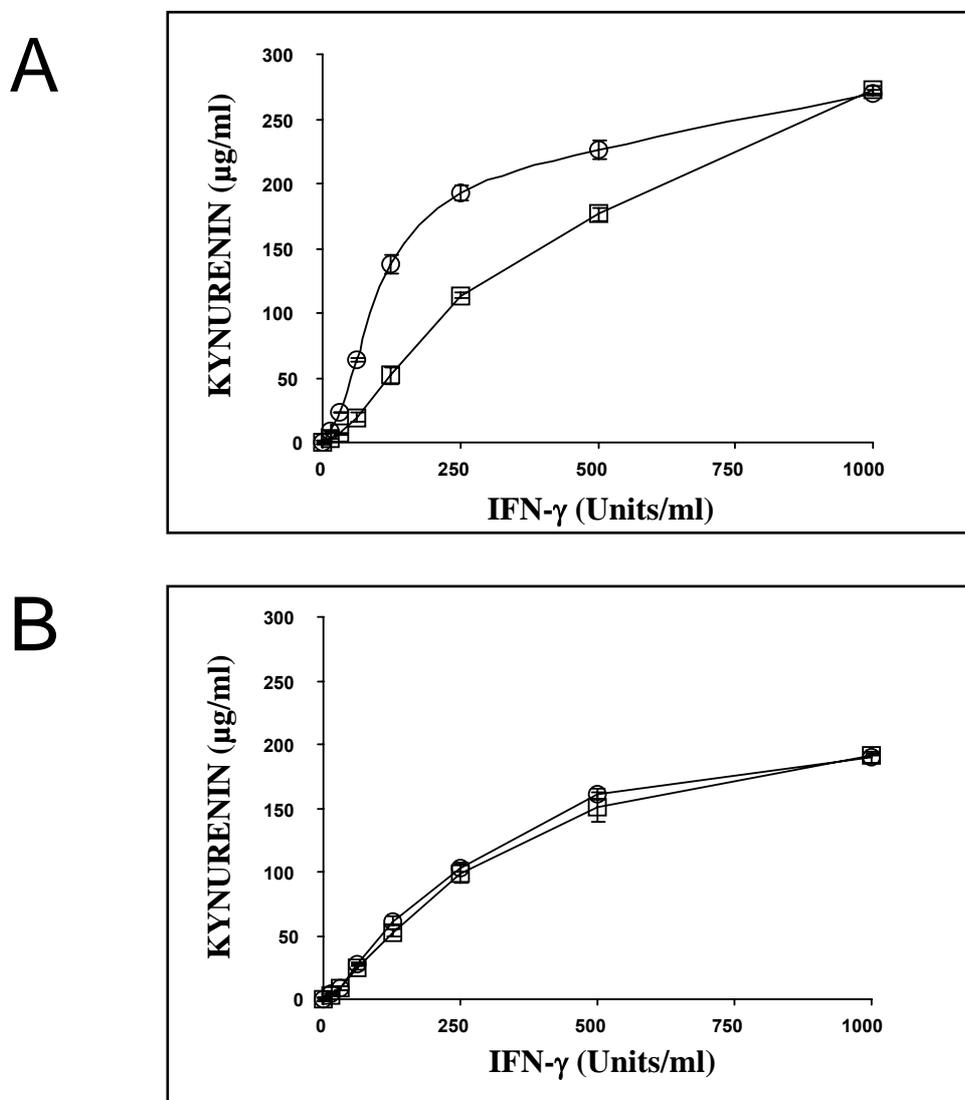


Abbildung 4.22: IDO-Induktion in Ab- und Anwesenheit einer MV-Infektion.

A549-Zellen (A) und HBMECs (B) wurden 3 Tage lang mit ansteigenden IFN- γ -Konzentrationen versetzt und dann in Ab- (offene Quadrate) und Anwesenheit (offene Kreise) von MV (Edm; MOI =0,1) kultiviert. Nach 3 Tagen Postinfektion wurde die Kynureninkonzentration ermittelt.

Aus der Abbildung 4.22 lässt sich ablesen, dass die IDO-Aktivität nur bei der MV-infizierten Lungen-Epithelzelllinie A549 (A) höher ist als bei der infizierten Gehirn-Endothelzelllinie (HBMEC) (B). Zum Beispiel wurden die A549-Zellen mit 500 U/ml IFN- γ stimuliert und infiziert und nach 3 Tagen wird der Zellüberstand photometrisch gemessen. Dies ergibt einen Anstieg der Kynureninkonzentration um ca. 80 μ g/ml. Da eine direkte Proportionalität zwischen Kynureninkonzentration und IDO-Wirksamkeit gilt, kann festgehalten werden, dass infizierte humane Epithelzellen aus der Lunge gegenüber nicht infizierten eine deutlich höhere IDO-Aktivität aufweisen.

4.6.3 Nachweis des IDO-Proteins

Im biochemischen IDO-Assay konnte nachgewiesen werden, dass sich die IDO-Aktivität in den infizierten A549-Zellen erhöht hat (Abb. 4.22), während dies in den HBMECs hingegen nicht der Fall war. Anhand dieses Experiments sollte das IDO-Protein als solches ohne Zusatz von exogenem L-Trp im Western Blot nachgewiesen werden. Dazu wurde das IDO-Protein in A549-Zellen und HBMECs in Ab- und Anwesenheit einer MV-Infektion und einer IFN- γ -Stimulation nachgewiesen.

In Abbildung 4.23 sieht man in den nicht infizierten A549-Zellen erst bei den IFN- γ Konzentrationen von 250-1000 U/ml eine leichte IDO-Proteinexpression. Werden die A549-Zellen mit IFN- γ stimuliert und dazu noch mit MV infiziert, erkennt man schon bei einer niedrigen IFN- γ -Konzentration (100 U/ml) eine deutliche Expression des IDO-Proteins. Die MV-Infektion, anhand der MV N-Proteinexpression detektierbar, nimmt bei 100 U/ml IFN- γ ab und bleibt auch bei Behandlungen mit höheren Konzentrationen an IFN- γ konstant. Dazu zeigt sich, dass MV-infizierte A549-Zellen das MxA Protein exprimieren. Eine zusätzliche Stimulation mit IFN- γ spielt bei der MxA-Proteinexpression keine Rolle.

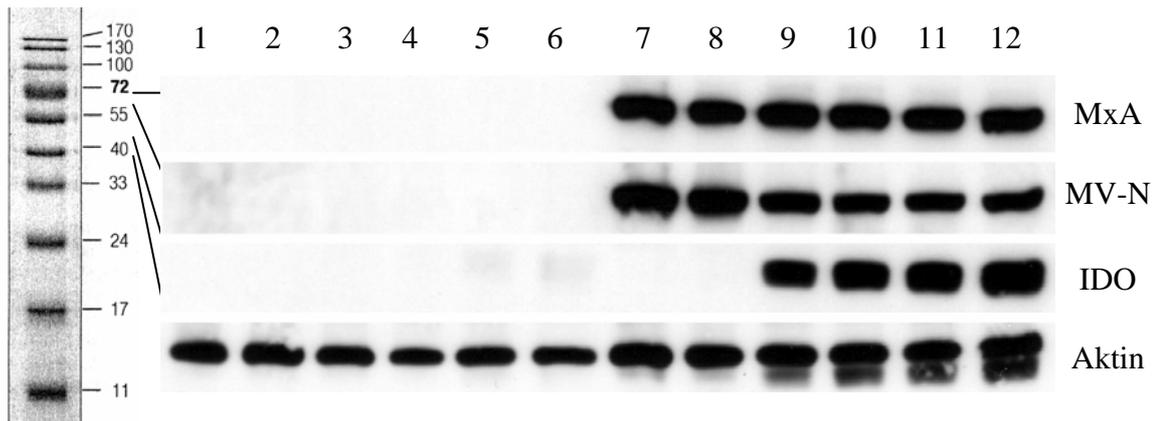


Abbildung 4.23: IDO und MxA Nachweis in A549-Zellen in Ab- und Anwesenheit einer MV-Infektion (MV Edm, MOI = 0,1; 3 dpi) mit der Western-Blot-Methode.

Die nicht infizierte (Gelspuren 1-6) und die MV-infizierte (Gelspuren 7-12) Lungen-Epithelzelllinie A549 wurde mit den IFN- γ -Konzentrationen von 0 U/ml (Gelspuren 2, 8), 100 U/ml (Gelspuren 3, 9), 250 U/ml (Gelspuren 4, 10), 500 U/ml (Gelspuren 5, 11) bis 1000 U/ml (Gelspuren 6, 12) stimuliert und nach 3 Tagen Postinfektion zu Proteinlysaten verarbeitet. Pro Gelspur wurde jeweils ca. 40 μ g Proteinlysat aufgetragen und das 70 kDa große MxA-Protein mit dem mAk MxA143, das 60 kDa große MV N-Protein mit dem mAk F227, das 45 kDa große IDO-Protein mit dem mAk IDO10.1 und das 42 kDa große Aktin-Protein als Ladekontrolle mit dem Kaninchen-Antiserum detektiert.

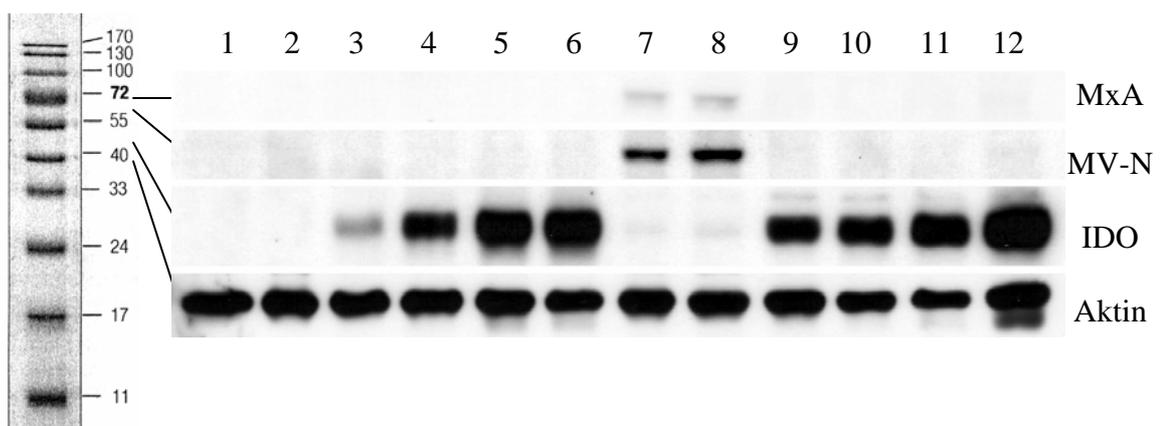


Abbildung 4.24: IDO und MxA Nachweis in HBMECs in Ab- und Anwesenheit einer MV-Infektion (MV Edm, MOI = 0,1; 3dpi) mit der Western-Blot-Methode.

Die nicht infizierte (Gelspuren 1-6) und die MV-infizierte (Gelspuren 7-12) Gehirn-Endothelzelllinie (HBMEC) wurde mit den IFN- γ -Konzentrationen von 0 U/ml (Gelspuren 2, 8), 100 U/ml (Gelspuren 3, 9), 250 U/ml (Gelspuren 4, 10), 500 U/ml (Gelspuren 5, 11) bis 1000 U/ml (Gelspuren 6, 12) stimuliert und nach 3 Tagen Postinfektion zu Proteinlysaten verarbeitet. Pro Gelspur wurde jeweils ca. 30 μ g Proteinlysat aufgetragen und das 70 kDa große MxA-Protein mit dem mAk MxA143, das 60 kDa große MV N-Protein mit dem mAk F227, das 45 kDa große IDO-Protein mit dem mAk IDO10.1 und das 42 kDa große Aktin-Protein als Ladekontrolle mit dem Kaninchen-Antiserum detektiert.

In Abbildung 4.24 erkennt man in den nicht infizierten HBMECs eine schwache IDO-spezifische Bande schon bei 100 U/ml IFN- γ . Diese nimmt an Intensität mit ansteigenden IFN- γ -Konzentrationen zu. Werden die HBMECs mit IFN- γ stimuliert und dazu noch mit MV infiziert, sieht man eine ansteigende IDO-Proteinexpression. Die MV-Infektion, anhand der MV N-Proteinexpression detektierbar, ist nur bei unbehandelten Zellen zu sehen. Dazu zeigt sich, dass MV-infizierte HBMECs das MxA Protein nur äußerst schwach exprimieren. Eine zusätzliche Stimulation mit IFN- γ spielt bei der MxA-Proteinexpression keine Rolle.

4.7 STAT1 Aktivierung während einer MV-Infektion

STATs (Signal Transducers and Activators of Transcription) regulieren zytokin- und wachstumsfaktorabhängig wichtige zelluläre Prozesse. STAT1 (Stat 91/84) und STAT2 (Stat 113) wurden als erste Mitglieder der STAT Proteinfamilie identifiziert. Die 91 und 84 kDa großen Proteine kommen durch alternatives Spleißen des STAT1 Gens zustande. STAT1 und STAT2 Polypeptide enthalten SH2 und SH3 Domänen und stellen Komponenten des ISGF3 (Interferon-stimulated gene factor 3)-Komplexes dar. Binden Interferone an ihre entsprechenden Rezeptoren auf der Zelloberfläche, werden die STAT1 Untereinheiten am Tyrosinrest - Tyr701 - phosphoryliert (Shuai *et al.*, 1993 a,b; Darnell, 1997).

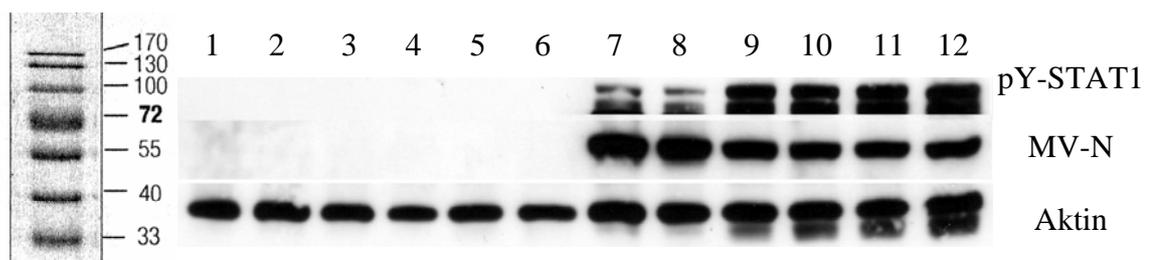


Abbildung 4.25: Western-Blot-Analyse zum Nachweis von pY-STAT1 (pY701) in Ab- und Anwesenheit einer MV-Infektion (MV Edm, MOI = 0,1; 3dpi) in A549-Zellen.

Die nicht infizierte (Gelspuren 1-6) und die MV-infizierte (Gelspuren 7-12) Lungenepithelzelllinie A549 wurde mit den IFN- γ -Konzentrationen von 0 U/ml (Gelspuren 2, 8), 100 U/ml (Gelspuren 3, 9), 250 U/ml (Gelspuren 4, 10), 500 U/ml (Gelspuren 5, 11) bis 1000 U/ml (Gelspuren 6, 12) stimuliert und nach 3 Tagen Postinfektion zu Proteinlysaten verarbeitet. Pro Gelspur wurde jeweils ca. 30 μ g Proteinlysate aufgetragen und das 91/84 kDa große pY-STAT1 (pY704) Protein mit dem mAk Stat1 (pY701), das 60 kDa große MV N-Protein mit dem mAk F227 und das 42 kDa große Aktin-Protein als Ladekontrolle mit dem Kaninchen-Antiserum detektiert.

In Abbildung 4.25 kann man erkennen, dass sich eine Phosphorylierung des Tyrosinrestes im STAT1-Protein weder in uninfizierten noch in IFN- γ stimulierten

A549-Zellen ereignet. Hingegen zeigen MV-infizierte A549-Zellen, erkennbar an der MV N-Protein Expression, eine deutliche pY-STAT1 (pY701) Aktivierung. Werden diese MV-infizierten Zellen zusätzlich noch mit IFN- γ stimuliert, kommt es zu einer deutlichen Steigerung der Phosphorylierung von STAT1.

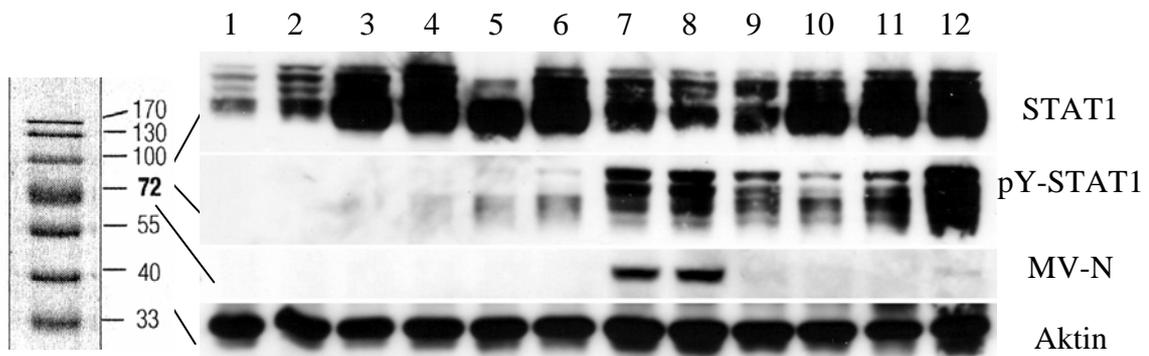


Abbildung 4.26: Western-Blot-Analyse zum Nachweis von STAT1 und pY-STAT1 (pY701) in Ab- und Anwesenheit einer MV-Infektion (MV Edm, MOI = 0,1; 3dpi) in HBMECs.

Die nicht infizierte (Gelspuren 1-6) und die MV-infizierte (Gelspuren 7-12) Gehirn-Endothelzelle (HBMEC) wurde mit den IFN- γ -Konzentrationen von 0 U/ml (Gelspuren 2, 8), 100 U/ml (Gelspuren 3, 9), 250 U/ml (Gelspuren 4, 10), 500 U/ml (Gelspuren 5, 11) bis 1000 U/ml (Gelspuren 6, 12) stimuliert und nach 3 Tagen Postinfektion zu Proteinlysaten verarbeitet. Pro Gelspur wurde jeweils ca. 40 μ g Proteinlysate aufgetragen und das 91/84 kDa große STAT1 Protein mit dem mAk Stat1, das 91/84 kDa pY-STAT1 (pY704) Protein mit dem mAk Stat1 (pY701), das 60 kDa große MV N-Protein mit dem mAk F227 und das 42 kDa große Aktin-Protein als Ladekontrolle mit dem Kaninchen-Antiserum detektiert.

Uninfizierte A549-Zellen zeigen keine Expression des phosphorylierten STAT1 Proteins. Hingegen erkennt man in Abbildung 4.26, dass uninfizierte, mit IFN- γ stimulierte Gehirnendothelzellen eine schwache phosphorylierte STAT1-Expression aufweisen. Durch die IFN- γ Behandlung zeigen die HBMECs eine deutliche Expression des 91/84 kDa großen STAT1 Proteins. Infiziert man HBMECs jedoch mit MV, zeigt sich eine deutliche Expression sowohl des STAT1 Proteins als auch der phosphorylierten Form. Behandelt man die Zellen während der MV-Infektion zusätzlich

noch mit ansteigenden Konzentrationen an IFN- γ sieht man eine nahezu konstante STAT1 Proteinexpression, aber eine zunehmende Phosphorylierung des STAT1 Proteins. Die STAT1-Phosphorylierung nimmt bei gleicher Infektionsdosis mit zunehmender IFN- γ -Konzentrationen zu.

4.8 IDO im Zuge einer HSV-1 Infektion

Das Enzym IDO wird in Anwesenheit von IFN- γ an Entzündungsstellen bei verschiedenen Infektionskrankheiten induziert, die von unterschiedlichen Viren wie HIV, HTLV und SIV hervorgerufen werden (Burudi *et al.*, 2002; Grant *et al.*, 2000; Maloney *et al.*, 2000). Kürzlich konnte gezeigt werden, dass IDO auch eine antivirale Aktivität bei Infektionen mit CMV, HSV-1 und HSV-2 besitzt (Adams *et al.*, 2004a,b; Bodaghi *et al.*, 1999). Aufgrund dessen wurde die Proteinexpression von IDO ohne Zusatz von exogenen L-Tryptophan im Western-Blot detektiert.

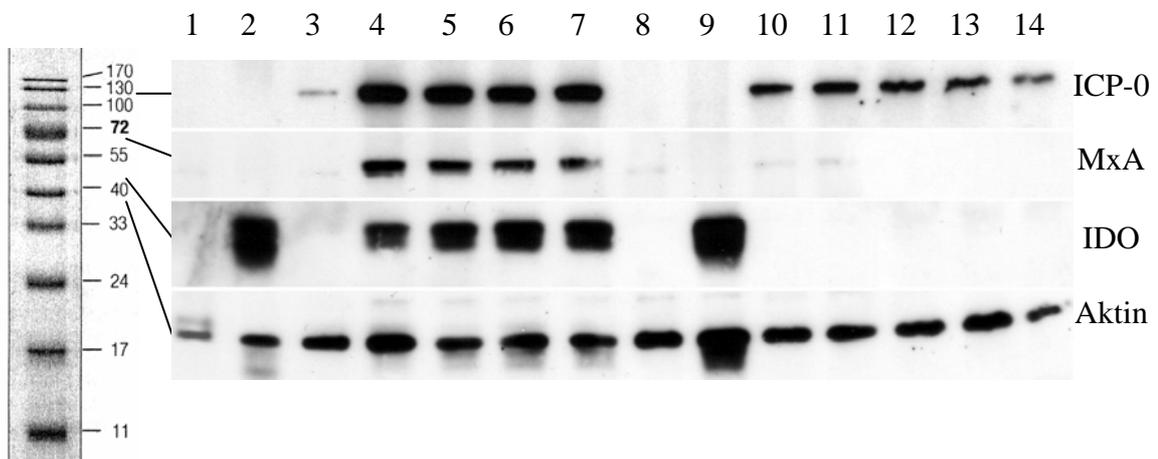


Abbildung 4.27: IDO und MxA Nachweis in A549-Zellen und HBMECs während einer HSV-1 Infektion (MOI = 0,1; 3dpi) mit der Western-Blot-Methode.

A549-Zellen (Gelspuren 1-7) und HBMECs (Gelspuren 8-14) wurden mit den IFN- γ -Konzentrationen von 0 U/ml (Gelspuren 3, 10), 100 U/ml (Gelspuren 4, 11), 250 U/ml (Gelspuren 5, 12), 500 U/ml (Gelspuren 6, 13) bis 1000 U/ml (Gelspuren 7, 14) stimuliert, mit HSV-1 (Gelspuren 3-7, 10-14) infiziert und nach 3 Tagen Postinfektion zu Proteinlysaten verarbeitet. Pro Gelspur wurde jeweils ca. 30 μ g Proteinlysate aufgetragen und das 110 kDa große HSV-1

ICP0-Protein mit dem mAk ICP0, das 70 kDa große MxA-Protein mit dem mAk MxA143, das 45 kDa große IDO-Protein mit dem mAk IDO10.1 und das 42 kDa große Aktin-Protein als Ladekontrolle mit dem Kaninchen-Antiserum detektiert. Als IDO-Expressionskontrolle wurden in Gelspur 2 MV-infizierte, 1000 U/ml IFN- γ behandelte A549-Zellen und in Gelspur 9 MV-infizierte, 1000 U/ml IFN- γ behandelte HBMECs verwendet. Die undeutliche HSV-1 Infektion in Gelspur 3 beruht auf einem technischen Problem.

In der Abbildung 4.27 erkennt man, dass sowohl A549-Zellen als auch HBMECs im Zuge einer HSV-1 Infektion kein IDO-Protein exprimieren. Werden A549-Zellen aber mit HSV-1 infiziert und dazu noch mit ansteigenden Konzentrationen an IFN- γ behandelt, sieht man eine Zunahme der IDO-Proteinexpression. Diese infizierten Zellen exprimieren zusätzlich noch das MxA-Protein. In den Gehirndothelzellen zeigt IFN- γ bei ansteigenden Konzentrationen einen deutlichen antiviralen Effekt. Dies wird an der Abnahme der Bandenintensität des Herpes Simplex Virus Type I Immediate Early Proteins (ICP0) deutlich. Besonders hervorzuheben ist, dass HSV-1 infizierte, IFN- γ behandelte mikrovaskuläre Gehirndothelzellen (HBMEC) das Enzym IDO nicht mehr exprimieren.

4.9 Wirkung von Tryptophan

1988 konnten Takikawa *et al.* nachweisen, dass der IDO-induzierte antipathogene Effekt durch die Zugabe von Tryptophan ins Zellkulturmedium spezifisch aufgehoben werden kann. 1999 konnte Bodaghi *et al.* beweisen, dass die IDO-Aktivierung für die Inhibition der humanen CMV in RPE-Zellen verantwortlich ist. Dieser IDO-induzierte antivirale Effekt konnte dann auch durch die Zugabe von Tryptophan supplementiert werden. Im Jahre 2004 konnte schließlich Adams *et al.*, a,b zeigen, dass die IFN- γ -induzierte IDO-Aktivität ein starker antiviraler Effektormechanismus zur Kontrolle von HSV-1 oder HSV-2 in Astrozyten ist.

Um diese IDO-induzierte antivirale Wirkung auch bei MV zu testen, wurde zuerst die Epithelzelllinie A549 mit IFN- γ stimuliert und in Ab- und Anwesenheit von 100 μ g/ml

L-Tryptophan infiziert. Außerdem wurden diese Zellen auch mit IL-1 β (100 U/ml) stimuliert und die Virustiter mit entsprechender Behandlung ermittelt. Um einen Vergleich zu haben, wurde dann auch noch die Endothelzelllinie HBMEC mit ansteigenden Konzentrationen an IFN- γ stimuliert und in Ab- und Anwesenheit von 100 g/ml L-Tryptophan infiziert. Genauso wie die A549-Zellen wurden die HBMECs mit IL-1 β (100 U/ml) stimuliert und die Virustiter mit entsprechender Behandlung ermittelt.

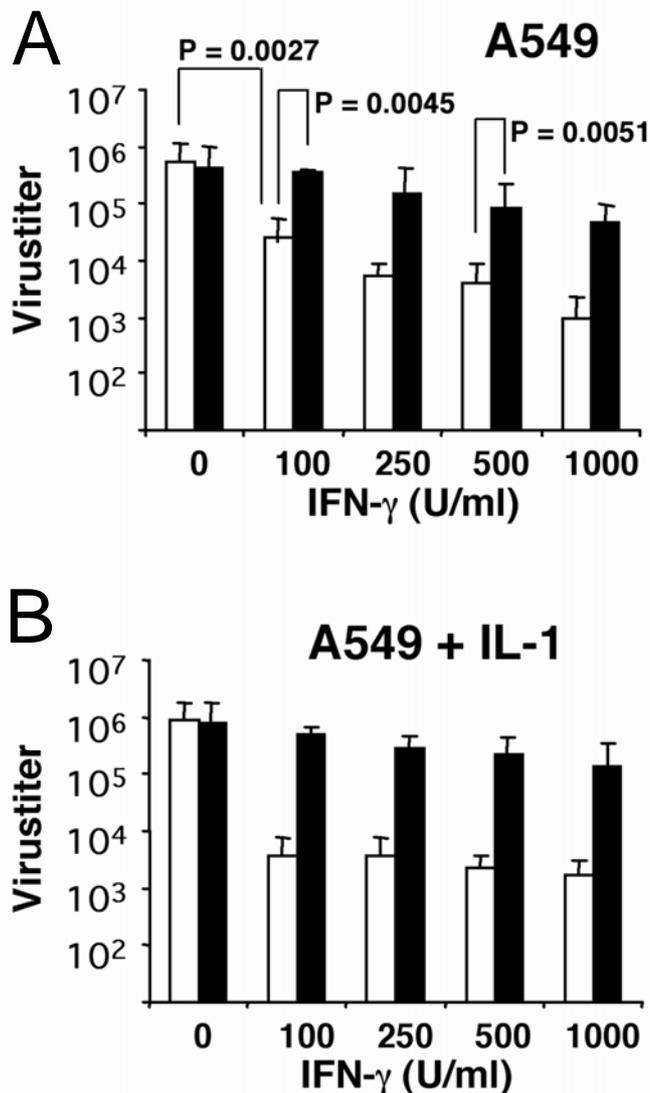


Abbildung 4.28: Aufhebung des IFN- γ -induzierten antiviralen Effektes durch Zusatz von Tryptophan.

A549-Zellen (A) und IL-1 β -stimulierte A549-Zellen (B) wurden mit dem MV-Stamm Edm (MOI = 0,1) infiziert und in Ab- (weiße Säulen) und Anwesenheit (schwarze Säulen) von 100 μ g/ml L-Tryptophan mit ansteigenden IFN- γ Konzentrationen behandelt. Nach 48 Stunden Postinfektion wurde der Virustiter bestimmt. Die Unterschiede zwischen Kontrollen (0 U/ml) und IFN- γ -stimulierten und zwischen mit und ohne Tryptophan behandelten Zellen sind hoch signifikant. Beispiele für P Werte in der Grafik sind angegeben.

Wie man in Abbildung 4.28 erkennen kann, führen ansteigende Konzentrationen von IFN- γ zu einer Reduktion der Titer des MV-Edm (weiße Säulen). Wird den infizierten A549-Zellen L-Tryptophan hinzu gegeben, kann dieser antivirale Effekt, der durch IFN-

γ induziert wird, nahezu aufgehoben werden. Werden die A549-Zellen noch zusätzlich mit IL-1 β (100 U/ml) stimuliert, führt dies bei niedrigen Konzentrationen von IFN- γ zu einer deutlichen Reduktion des Virustiters.

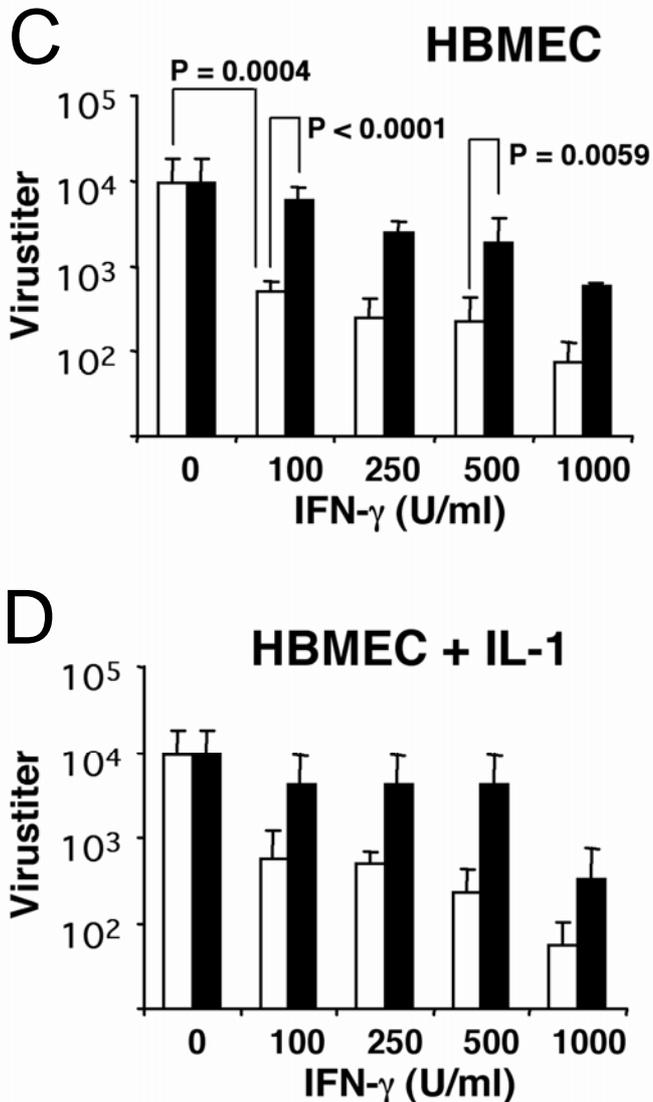


Abbildung 4.29: Aufhebung des IFN- γ -induzierten antiviralen Effekts durch Zusatz von Tryptophan.

HBMEC-Zellen (A) und IL-1 β -stimulierte HBMEC-Zellen (B) wurden mit dem MV-Stamm Edm (MOI = 0,1) infiziert und in Ab- (weiße Säulen) und Anwesenheit (schwarze Säulen) von 100 μ g/ml L-Tryptophan mit ansteigenden IFN- γ Konzentrationen behandelt. Nach 48 Stunden Postinfektion wurde der Virustiter bestimmt. Die Unterschiede zwischen Kontrollen (0 U/ml) und IFN- γ -stimulierten und zwischen mit und ohne Tryptophan behandelten Zellen sind hoch signifikant. Beispiele für *P* Werte in der Grafik sind angegeben.

Wie man in Abbildung 4.29 erkennen kann, führen ansteigende Konzentrationen von IFN- γ zu einer Reduktion der Titer des MV-Edm (weiße Säulen). Wird den infizierten HBMEC-Zellen L-Tryptophan hinzu gegeben, kann dieser antivirale Effekt, der durch IFN- γ induziert wird, nahezu aufgehoben werden. Werden den HBMECs noch zusätzlich mit IL-1 β (100 U/ml) stimuliert, führt dies ebenso zu einer Reduktion des Virustiters.

5 Diskussion

Nachdem im Jahre 2000 ein weiterer Rezeptor für Masernviren entdeckt wurde (Tatsuo *et al.*, 2000), war es eines der Ziele dieser Arbeit, die Infizierbarkeit von humanen Endothelzellen mit Masernviren zu charakterisieren, da Vakzine und Wildtypstämme eine differentielle Benutzung der MV-Rezeptoren aufweisen. Außerdem spielt der antivirale Effekt von Interferonen bei der Masernreplikation eine entscheidende Rolle. Nach einer akuten Infektion mit Masern und nach der Masernimpfung wurden erhöhte Werte an Interferon- γ im Serum dieser Patienten gefunden (Okada *et al.*, 2001; Ovsyannikova *et al.*, 2003). Zusätzlich wurde IFN- γ auch in den Gehirnen von Patienten, die an der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE), einer Masernkomplikation, leiden, detektiert (Nagano *et al.*, 1994). Deshalb war es ein weiteres Ziel dieser Arbeit, diesen antiviralen Mechanismus von IFN in Endothelzellen genauer zu analysieren.

5.1 Charakterisierung der MV-Rezeptoren in EZ

Nachdem im Jahre 1993 CD46 (MCP) und im Jahre 2000 CD150 (SLAM) als MV-Rezeptoren identifiziert wurden (Dörig *et al.*, 1993; Nanche *et al.*, 1993 a,b; Tatsuo *et al.*, 2000), wurde die Expression dieser Rezeptoren in humanen Endothelzellen näher untersucht. Dazu wurden die humane mikrovaskuläre Gehirn-Endothelzelllinie (HBMEC) von Prof. K. S. Kim (Stins *et al.*, 1997) und primäre humane Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) verwendet.

In dieser Arbeit wurde zuerst ein Nachweis der bekannten MV-Rezeptoren mittels RT-PCR Technik und anschließend anhand der Western-Blot-Methode durchgeführt. Ein wesentliches Ergebnis meiner Arbeit war, dass HBMECs und HUVECs nur den MV-Rezeptor CD46 als Transkript und auf der Oberfläche exprimieren. Sie zeigten weder

auf RNA- noch auf Proteinebene eine SLAM-Expression. Daher könnten theoretisch nur die MV-Vakzine humane Endothelzellen infizieren, denn diese benutzen CD46 als Rezeptor. Humane B-Zellen (BJAB) wiesen neben CD46 auch den Wildtyp-MV-Rezeptor CD150 auf. SLAM wird auf der Oberfläche von B-Zelllinien, von primären aktivierten B- und T-Zellen, aktivierten Monozyten und reifen DZ exprimiert (Cocks *et al.*, 1995; Polacino *et al.*, 1996; Punnonen *et al.*, 1997; Minagawa *et al.*, 2001; Ohgimoto *et al.*, 2001). Minagawa *et al.* konnten zeigen, dass SLAM in primären Monozyten vor allem durch UV-inaktiviertes MV (UV-MV) (12,2%), aber auch durch Phytohämagglutinin (PHA) (8,8%), bakterielles Lipopolysaccharid (LPS) (6,5%), und infektiöses MV (6,3%) induziert werden kann. Ferner zeigten reife DZ eine verstärkte SLAM-Expression, wenn diese durch Interleukin-1 β behandelt wurden (Kruse *et al.*, 2001).

In meiner Arbeit konnten in HBMECs hingegen kein SLAM durch folgende Stimulanzen GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , PamCSK TNF- α und UV-MV induziert werden. Daraus lässt sich schließen, dass humane mikrovaskuläre Gehirndothelzellen von Wildtyp-MV eigentlich nicht infiziert werden können, da diese den entsprechenden Rezeptor nicht exprimieren und dieser durch verschiedene Stimulanzen nicht induziert werden kann.

5.2 Infizierbarkeit der EZ durch MV

Nach einer akuten Infektion des oberen Respirationstraktes und anschließender systemischer Infektion verbreitet sich das Masernvirus in den verschiedenen Organen. In jenen vermehren sich die MV hauptsächlich in Epithelzellen, Endothelzellen und Monozyten/Makrophagen (Griffin & Bellini, 1996). Weiterhin wurden MV-infizierte Gehirndothelzellen und epitheliale Kapillaren in Lymphknoten und Thymus in fatalen Fällen von akuten Masern gefunden (Moench *et al.*, 1988; Esolen *et al.*, 1995). In SSPE-Patienten wurden neben verschiedenen neuronalen Zellen auch Gehirndothelzellen, die scheinbar infiziert waren, identifiziert (Kirk *et al.*, 1991; Isaacson *et al.*, 1996; Allen *et al.*, 1996). Nachdem die MV-Rezeptoren CD46 und CD150 identifiziert wurden, häuften sich die Beweise, dass viele Wildtyp-MV-Isolate in einer

CD46- und CD150-unabhängigen Weise einen Tropismus für Epithel-, Endothelzellen und neurale Zellen wie Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten aufweisen (McQuaid & Cosby, 2002). Vermehrte Beobachtungen ließen auch auf das Vorhandensein eines noch unbekanntem Aufnahmemechanismus oder unbekanntem Rezeptors schließen (Hashimoto *et al.*, 2002; Koumoumou & Wild, 2002; Nielsen *et al.*, 2001; Takeuchi *et al.*, 2002).

Daher wurden in dieser Arbeit primäre Endothelzellen aus der Nabelschnurvene (HUVEC) isoliert und mit dem Impfstamm Edmonston und mit verschiedenen Wildtypisolaten (Wü4797, Wü5679, WTFb) infiziert. Nach zwei Tagen wurden die Zellen auf die Oberflächenexpression des Hämagglutininproteins der Masernviren untersucht. Es konnte gezeigt werden, dass mit MV-Edm-infizierte HUVECs eine hohe H-Expression aufweisen. Dies liegt daran, dass diese Zellen den MV-Rezeptor CD46 auf der Oberfläche exprimieren. Dadurch kann das virale Hüllprotein H mit dem zellulären Rezeptor MCP interagieren und die Virusaufnahme einleiten, welche einen großen Einfluss auf die Pathogenese Virus-induzierter Erkrankungen besitzt (Schneider-Schaulies *et al.*, 2000). Parallel dazu konnte dargelegt werden, dass die Infektion der HUVECs mit Edm zu einer Downregulation von CD46 auf 50% führt. Diese Modulation des Vakzinerezeptors wurde schon 1995 beschrieben (Schneider-Schaulies *et al.*, 1995 a,b). Vergleicht man damit die H-Expression der Wildtyp-MV, fällt auf, dass nur der MV-Stamm Wü4797 eine vermehrte H-Expression (30%) auf der HUVEC-Oberfläche zeigt. Die H-Expression von Wü5679 und WTFb entsprechen der BJAB-Kontrolle. Vergleicht man die CD46-Expression dieser infizierten Zellen so lässt sich keine Downregulation feststellen.

Insgesamt bleibt festzuhalten, dass vor allem der MV-Stamm Wü4797 HUVECs infizieren kann, obwohl der eigentliche MV-Wildtyp-Rezeptor SLAM nicht auf diesen Zellen exprimiert wird. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass dieser MV-Wildtypstamm primäre Endothelzellen in eine CD46- und CD150-unabhängige Weise infizieren kann. Der Rezeptor-unabhängige Mechanismus der Virusausbreitung durch Mikrofusionen an Synapsen könnte die Notwendigkeit eines spezifischen Rezeptors im Gewebe des Wirtes umgehen (Allen *et al.*, 1996; Urbanska *et al.*, 1997; McQuaid *et al.*, 1998; Duprex *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 2000). Betrachtet man dazu die in dieser Arbeit anhand eines Plaque-Tests dargestellte MV-Infektion (Edm, Wü4797) in

HBMECs dann lässt sich aus diesen Ergebnissen ablesen, dass der MV-Stamm Edmonston innerhalb von 3 Tagen von 5×10^4 pfu/ml als Inokulum auf einen Virustiter von 9×10^5 pfu/ml steigt. Das deutet auf eine produktive, 18-fache Virusvermehrung hin. Analysiert man hingegen die Replikation des MV-Stammes Wü4797 in HBMECs, erkennt man nach 72 Stunden Postinfektion nur eine 2 fache Virusvermehrung (5×10^4 pfu/ml auf 1×10^5 pfu/ml). Daraus lässt sich zusammenfassend sagen, dass sich der Impfstamm Edm aufgrund der zellulären Expression von CD46 effektiv vermehren kann, während der Wildtypstamm Wü4797 eine eher mäßige Virusproduktivität in HBMECs zeigt.

Somit bleibt noch unklar, warum bestimmte Wildtypmasernviren, besonders der Stamm Wü4797, sich zunehmend gut in primären Endothelzellen (HUVEC) ausbreiten können. Verschiedene Vermutungen stützen sich in diesem Zusammenhang auf die unterschiedliche Beschaffenheit der viralen Oberflächenproteine, die eine Rolle im unterschiedlichen Tropismus, bei der Virusaufnahme, bei der Zell-Zell-Fusion und in der Pathogenität spielen (Shibahara *et al.*, 1994; Bartz *et al.*, 1996; Lecouturier *et al.*, 1996; Johnston *et al.*, 1999; Moeller *et al.*, 2001; Moll *et al.*, 2001; Ohgimoto *et al.*, 2001; Plemper *et al.*, 2002; Takeuchi *et al.*, 2002).

Das MV ist monotypisch und es existiert ein einzelner Serotyp. Die Infektion mit einem MV-Stamm scheint eine lebenslange Immunität zu liefern. Mit dem Aufkommen der RT-PCR- und DNA-Sequenzieretechnik wurde klar, dass die verschiedenen Virusisolate sich in ihrer Nukleotidsequenz, besonders die letzten 150 Aminosäuren des N- Proteins und das gesamte H-Protein, unterscheiden (Rima *et al.*, 1997; Rota *et al.*, 1992, 1994; Taylor *et al.*, 1991). Mittlerweile sind über 250 Stämme sequenziert worden, die in 21 Genotypen zu 8 Gruppen unterteilt werden. In den USA und in England ist es nun möglich, einen Hinweis auf die Verbreitung der Stämme mittels bestimmter Indexfälle zu erhalten (Rota *et al.*, 2004). Dadurch hat man für die verschiedenen Masernausbrüche die Möglichkeit einzelne Übertragungsreihen der verschiedenen Genotypen zu erstellen (Rima & Duprex, 2005).

5.3 Wirkung von IFN auf die MV-Replikation in EZ

Das Immunsystem hat sich durch einen ständigen Kampf zwischen den Wirten und den Mikroben entfalten können. Zudem hat diese Entwicklung auch die Evolution mikrobieller Strategien gegen die Immunantwort und vice versa gefördert. Daher kennt man heute das Interferon (IFN) System des Wirtes und die viralen anti-IFN Strategien (Alcami & Koszinowski, 2000).

Es werden 3 Kategorien unterschieden. Die erste stellt die Funktionshemmung der IFN-induzierten antiviralen Proteine dar. Bei der zweiten kommt es zu einer Unterdrückung der IFN Produktion und die dritte zeigt eine Interferenz mit der IFN Signaltransduktion. Die ersten beiden Wege sind bei DNA- und RNA-Viren vorhanden, während die dritte Strategie eigentlich nur bei DNA-Viren - mit Ausnahme einiger Vertreter der Paramyxoviren - zu finden ist (Cebulla *et al.*, 1999).

Das Genom der Paramyxoviren besteht aus den Genen, die für das Nukleokapsid (N), Phospho- (P), Matrix- (M), Fusion- (F), Hämagglutinin (Neuraminidase)- (H/N) und Large- (L) Protein codieren.

<i>PARAMYXOVIRINAE</i>		RNA-Editing			Überlappende Leserahmen			
VIRUS		+0G +1(oder+4)G +2G			C ORF			
Respiroviren	Sendai-Virus	P	V	W	C'	C	Y1	Y2
	Humanes Parainfluenzavirus Typ 1	P	-	-	C'	C	-	-
	Bovines Parainfluenzavirus Typ 3	P	V	D	-	C	-	-
	Humanes Parainfluenzavirus Typ 3	P	(V)	D	-	C	-	-
Morbilliviren	Masernvirus	P	V	W	-	C	-	-
Rubulaviren	Simian-Virus 5	V	I	P	-	-	-	-
	Simian-Virus 41	V	I	P	-	-	-	-
	Mumpsvirus	V	I	P	-	-	-	-
	Humanes Parainfluenzavirus Typ 2	V	I	P	-	-	-	-
	Newcastle-Disease-Virus	P	V	I	-	-	-	-

Tabelle 5.1: Zusätzliche Proteine, die vom P-Gen der *Paramyxovirinae* codiert werden.

(verändert nach Gotoh *et al.*, 2001)

Das P-Gen der Paramyxoviren ist einzigartig, denn durch RNA-Editing und aufgrund überlappender Leserahmen werden mehrere Proteine exprimiert. Dies führt bei Sendai-Viren zur Expression von 8 zusätzlichen Proteinen, das P, V, W, C', C, Y1, Y2 und X (Gotoh *et al.*, 2001). Bei den MV codiert das P-Gen für das an der Transkription beteiligte P-Protein, für das C- und für das V-Protein (Bellini *et al.*, 1985), die beide bei der Hemmung des Typ I-Interferon Signalweges (Shaffer *et al.*, 2003; Palosaari *et al.*, 2003) und als Virulenzfaktoren *in vivo* eine Rolle spielen (Patterson *et al.*, 2000). Attenuierte Masernviren können sich ohne C- und V-Protein in Vero-Zellen, die ein Gendefekt in der IFN Produktion haben (Emeny & Morgan, 1979), uneingeschränkt vermehren (Radecke & Billeter, 1996; Schneider *et al.*, 1997). Das C-Protein wird aber bei einer effizienten Vermehrung in humanen peripheren Blutlymphozyten benötigt (Escoffier *et al.*, 1999).

In früheren Studien konnte gezeigt werden, dass die Replikation der MV-Impfstämme durch die Typ I-Interferone gehemmt werden kann (Wu & Shiro, 1984; Crespi *et al.*, 1986). Neuere Studien belegen, dass MV-Wildtypstämme hingegen die Fähigkeit besitzen, der IFN α/β -Antwort durch Induktionshemmung und Blockade der intrazellulären Vorgänge entgegenzuwirken. Die viralen Proteine C und V sind daran beteiligt (Patterson *et al.*, 2000; Shaffer *et al.*, 2003), indem sie mit den zellulären STAT Proteinen und IRF9 interagieren (Palosaari *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2003; Yokata *et al.*, 2003).

In meiner Arbeit wurden humane mikrovaskuläre Gehirndothelzellen (HBMEC) mit dem Impfstamm Edmonston infiziert und gleichzeitig mit dem Typ I-Interferon α oder mit dem Typ II-Interferon behandelt. Nach 4 Tagen konnte eine deutliche Reduktion der Virusplaquebildung bei den IFN-behandelten Zellen beobachtet werden. Zusätzlich konnte dies auch in der Immunzytologie durch die Expression des viralen N-Proteins bekräftigt werden. Werden Edm-infizierte und mit IFN-behandelte HBMECs mittels der Immunfluoreszenz-Methode gefärbt, so erkennt man eine deutliche Reduktion der Syncytienbildung. Besonders IFN- γ reduziert die Plaquegröße und lässt die Bildung von kleinen punktförmigen Nukleokapsidkomplexen erkennen. Zusätzlich wurden die HBMECs noch mit dem Wildtypmasernvirus Wü4797 infiziert und ebenfalls mit IFN- α oder mit IFN- γ stimuliert. Dort erkennt man nur bei IFN- γ eine Reduktion der Virusausbreitung und die Bildung kleinerer Nukleokapsidkomplexe. Typ I-Interferon

scheint die Wü4797-Infektion in HBMECs nicht zu beeinflussen, da man gegenüber der Mediumkontrolle keinen Unterschied in der Expression des N-Proteins sieht. Diese Ergebnisse weisen darauf hin, dass MV-Edm in Endothelzellen gegenüber allen getesteten IFN sensitiv ist. Hingegen hemmt der MV-Wildtypstamm Wü4797 die Wirkung von Typ I-IFN. Dies wird möglicherweise auf die viralen Proteine C und V zurückzuführen sein. Jene interagieren mit den zellulären STAT Proteinen und mit IRF-9 (Palosaari et al., 2003; Takeuchi *et al.*, 2003; Yokota *et al.*, 2003). Dadurch kann der IFN α/β -Signaltransduktionsweg beeinflusst werden. Durch die Experimente in meiner Arbeit konnte ich erstmals belegen, dass IFN- γ eine zelltypspezifische intrazelluläre Aktivität gegenüber Masernviren (Impf- und Wildtypstämme) *in vitro* aufweist. Es ist bekannt, dass das IFN- γ , eines der TH1-Zytokine, die Replikation verschiedenster Viren wie Herpesviren (Cantin *et al.*, 1999; Sainz & Halford, 2002), Humane Parainfluenzaviren (Choudhary *et al.*, 2001), Maus-Hepatitis-Viren (Parra *et al.*, 1999), Hepatitis-C-Viren (Frese *et al.*, 2002), Sindbisviren (Binder & Griffin, 2001), Vacciniaviren (Kündig *et al.*, 1993) und Vesicular-Stomatitis-Viren (Komatsu *et al.*, 1996) hemmt.

Hingegen konnte ich in B-Lymphozyten (BJAB-Zellen) nachweisen, dass das Typ II-Interferon keine Hemmung auf die Synzytienbildung und Virustiter der MV ausübt. Werden diese infizierten Zellen mit IFN- α stimuliert, so erkennt man nur bei den Edm-infizierten BJAB-Zellen eine Senkung des Virustiters.

5.4 Korrelation des antiviralen Effektes mit der Induktion der IDO-Aktivität

Im Jahre 1963 isolierte die Gruppe von Hayaishi ein Enzym, welches Tryptophan in Kynurenin umwandelt, die sogenannte Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) (Higuchi *et al.*, 1963; Shimizu *et al.*, 1978). Im Gegensatz zur Tryptophan 2,3-Dioxygenase, welche hauptsächlich in der Leber für den Tryptophanabbau zuständig ist, wird IDO ubiquitär in nichthepatischen Organen der Säugetiere exprimiert. Die höchsten Aktivitäten dieses Enzyms findet man in der Lunge und in der Plazenta (Shimizu *et al.*, 1978; Yamazaki *et al.*, 1985). IDO besitzt ein weites Spektrum von Substraten, welche L- und D-Tryptophan, Tryptamin, 5-Hydroxytryptophan und Serotonin beinhalten. In frühen Studien konnte gezeigt werden, dass IDO *in vivo* in der Lunge von Mäusen durch LPS (Yoshida & Hayaishi, 1978), durch Viren (Yoshida *et al.*, 1979), durch IFN (Carlin *et al.*, 1987) und durch TNF (Bianchi *et al.*, 1988) induziert werden kann.

In meiner Arbeit konnte ich erstmals eine Korrelation des antiviralen Effektes mit der Induktion der IDO-Aktivität nachweisen. IFN- γ wies auf der einen Seite eine zelltypspezifische intrazelluläre Aktivität gegenüber Masernviren auf. Genau in diesen Zellen konnte eine IDO-Aktivität durch IFN- γ auf der anderen Seite induziert werden. Diese Induktion konnte wiederum durch IL-1 β oder TNF- α oder in Kombination verstärkt werden. Vergleichende synergistische Effekte von TNF- α auf IFN- γ wurden von verschiedenen Gruppen beschrieben (Djeu *et al.*, 1986; Carlin *et al.*, 1987). 2003 beschrieb Robinson *et al.* dass es neben IFN regulatorischen Faktor-1 (IRF-1) eine neue Sequenz, die GAS (gamma activation sequence, GAS-3) gibt. Diese ist in der Regulation der IDO Transkriptionsrate, die von IFN- γ und TNF- α induziert wird, involviert (Robinson *et al.*, 2003 a,b).

Wurden zum Beispiel die Epithelzelllinie (A549) und die Endothelzelllinie (HBMEC) mit IFN- γ stimuliert, zeigten diese einerseits eine Aktivität gegen MV und andererseits eine IDO-Induktion. Schon Ende der 80er Jahren wurde Versuche gemacht, um IDO zu induzieren. Bianchi *et al.*, haben verschiedene IFN und Zytokine verwendet, um in Mäusen eine IDO-Aktivität nachzuweisen (Bianchi *et al.*, 1988). In der Tabelle 5.2 sind alle bis 1991 getesteten Zelllinien aufgelistet, die nach IFN-Behandlung IDO bzw. kein

IDO exprimieren. In dieser Liste findet man auch die von mir getesteten Zelllinien (A549, THP-1, HeLA, IMR-32). Diese Liste kann nun durch folgende IDO-exprimierenden Zelllinien ergänzt werden: ARPE19 – Netzhautpigment, RPE – Netzhautpigment (Bodaghi *et al.*, 1999), HBMEC – mikrovaskuläres Gehirndothel (Obojes *et al.*, 2005), HUVEC – Nabelschnurvene (Obojes *et al.*, 2005), U373 (Adams *et al.*, 2004 a,b), Vero – Niere (Obojes *et al.*, 2005), 86HG39 – Astrozytoma (Adams *et al.*, 2004 a,b; Obojes *et al.*, 2005) und 2D9 (Adams *et al.*, 2004 a,b). Weiterhin kommen noch jene Zelllinien hinzu, die nicht IDO exprimieren: SK-N-MC – Neuroblastoma (Obojes *et al.*, 2005), NT2 – Neuroblastoma (Obojes *et al.*, 2005), BJAB – B-Zellen (Obojes *et al.*, 2005) und Jurkat – T-Zell-Leukämie.

Cell line	Origin	Reference
THP-1	Monocytic leukemia	11, 36
MRC-5	Normal fetal lung	11
HEL	Embryonic lung	12
FL	Amnion	12
HEp-2	Larynx epidermoid carcinoma	11, 13
KB	Oral epidermoid carcinoma	11
A-431	Epidermal carcinoma	12, 35
A-498	Kidney carcinoma	35
WiDr	Colon adenocarcinoma	11
OKK	Maxillary gland carcinoma	12
KATO-III	Stomach carcinoma	12
HeLA	Cervical carcinoma	12, 13
ME180	Cervical carcinoma	8, 37
NY	Osteosarcoma	12
A549	Lung carcinoma	13, 35, 37, 42
T24	Bladder carcinoma	10, 13, 24, 33, 35, 42
J82	Bladder carcinoma	35
SK-Hep-1	Liver carcinoma	35
U138MG	Glioblastoma	35
SK-N-SH	Neuroblastoma	35
FS-4	Normal diploid fibroblast	33
WI-38	Lung, diploid	33

Cell line	Origin	Reference
HL-60	Promyelocytic leukemia	11
KG-1	Acute myelogenous leukemia	11
CCRF-SB	B cell leukemia	11
CCRF-CEM	T cell leukemia	11
U-937	Histiocytic leukemia	11, 33
NCI-H69	Small cell lung carcinoma	11
NCI-H128	Small cell lung carcinoma	11
A-427	Lung carcinoma	11
SW480	Colon adenocarcinoma	11
HLEC	Liver carcinoma	12
IMR-32	Neuroblastoma	12
Raji	Lymphoma	12
RPMI1788	Myeloma	12
1407	Normal embryonic intestine	11
HepG2	Hepatoma	35
CaCo2	Colon carcinoma	35
SKLU 1	Lung adenocarcinoma	37
SKCO 1	Colon adenocarcinoma	37
HT-29	Colon adenocarcinoma	37
BT-20	Breast carcinoma	37
MRC-5	Lung, diploid	37
Daudi	Burkitt lymphoma	33

Tabelle 5.2: Zelllinien, die nach IFN-Behandlung IDO (roter Kasten, links) bzw. kein IDO (blauer Kasten, rechts) exprimieren (verändert nach Taylor & Feng, 1991).

(Referenzen: (8) Feng & Taylor, 1989; (10) Byrne *et al.*, 1986; (11) Ozaki *et al.*, 1988; (12) Takikawa *et al.*, 1988; (13) de la Maza & Peterson, 1988; (33) Rubin *et al.*, 1988; (35) Werner-Felmayer *et al.*, 1989; (36) Werner-Felmayer *et al.*, 1990; (37) Aune & Pogue, 1989; (42) Pfefferkorn *et al.*, 1986)

5.5 IDO Induktion durch Viren?

Basierend auf der Publikation von Yoshida *et al.* die eine mehr als 100-fache Induktion der IDO-Aktivität in der Lunge von Mäusen 11 Tage nach der Infektion mit Influenzaviren (Influenza/AO/PR8/34) beschrieben hat (Yoshida *et al.*, 1979) und dem Experiment von Grant *et al.* nach dem nur bestimmte HIV Typ 1-Stämme die Fähigkeit besitzen, IDO in humanen Makrophagen zu induzieren (Grant *et al.*, 2000), stellte sich die Frage, ob Masernviren ebenfalls IDO in Zellkultur induzieren können. Dazu wurde die humane Lungenepithelzelllinie A549, welche nach IFN- γ -Stimulation eine sehr hohe IDO-Aktivität aufweist, in Ab- und Anwesenheit einer Maserninfektion auf die Induktion von IDO untersucht. Durch die Infektion mit MV wird in humanen Epithelzellen keine IDO induziert und nur in Kombination mit der IFN- γ -Stimulierung kann man die Kynureninkonzentration im Zellüberstand steigern. Bei HBMECs ist das nicht der Fall.

5.6 IDO als antivirales Enzym mittels Tryptophan?

Die Beteiligung der IDO an der Induktion des inhibitorischen Wachstumseffektes von IFN- γ auf intrazelluläre Parasiten wurde zum ersten Mal von Pfefferkorn *et al.* beobachtet (Pfefferkorn, 1984; Pfefferkorn *et al.*, 1986). Diese Gruppe beschrieb, dass die minimale Konzentration an IFN- γ , welche das Wachstum von *Toxoplasma gondii* in humanen Fibroblasten hemmt, immer zweifach höher im Dulbecco's modified Medium (DMEM) als im Eagle's minimal Medium (Eagle MM) war. Nach genauerer Analyse dieser Medien stellte sich heraus, dass Trp als verantwortlicher Faktor in diesen Medien für diesen Unterschied verantwortlich war, da DMEM 16 mg/Liter und Eagle MM 10 mg/Liter Trp enthält. Es folgten verschiedenste Studien, bei denen man Erreger mit unterschiedlichsten Faktoren wie LPS, IFN und TNF zu hemmen versuchte. Gab man jedoch exogenes Trp hinzu, so konnte man diesen inhibitorischen Effekt aufheben

(Byrne et al., 1986; Shemer-Avni *et al.*, 1988, 1989; Schmitz *et al.*, 1989). Es wurde immer klarer, dass die IDO-Aktivierung in humanen Zellen einen deutlichen antiparasitären und antibakteriellen Effektmechanismus darstellt (Däubener *et al.*, 1993, 1999, 2001; MacKenzie *et al.*, 1998 a,b; Schroten *et al.*, 2001).

1999 beobachteten Bodaghi *et al.* erstmals eine IFN- γ induzierte IDO-Aktivität in Bezug auf Viren. Sie behandelten humane Retinazellen (RPE-Zellen) mit IFN- γ und infizierten diese mit Cytomegalieviren. Sie sahen, dass mit zunehmender Konzentration an IFN- γ der Virustiter abnahm. Durch Zugabe von L-Trp konnte dieser antivirale Effekt jedoch völlig blockiert werden.

Basierend auf diesen Ergebnissen versuchten im Jahre 2004 Adams *et al.* a,b diesen antiviralen Effekt auf α -Herpesviren zu übertragen. Sie konnten beweisen, dass Herpes Simplex Virus Typ I und Typ II (HSV-1, HSV-2) in humanen Astrozyten replizieren kann und dass die Vorbehandlung dieser Zellen mit IFN in eine Dosis-abhängige Reduktion der Virusreplikation resultierte. Zudem untersuchten sie, ob der durch die einzelnen Interferone vermittelte antivirale Effekt durch die Zugabe eines Überschusses an L-Trp zu den Zellkulturen supplementiert werden kann. Die Experimente zeigten, dass nur der durch IFN- γ vermittelte antivirale Effekt fast vollständig aufgehoben werden konnte.

In Zusammenarbeit mit der Gruppe von Prof. Däubener in Düsseldorf versuchten wir diese Erkenntnisse auf Masernviren als Vertreter der Paramyxoviren zu übertragen. Dazu wurden in dieser Arbeit die IDO-exprimierende Lungenepithelzelllinie A549 und die ebenfalls IDO-exprimierende mikrovaskuläre Gehirndothelzelllinie HBMEC mit MV-Edm infiziert und mit ansteigenden Konzentrationen an IFN- γ stimuliert. Die Ergebnisse belegten, dass die Behandlung mit IFN- γ in eine Dosis-abhängige Reduktion der Virusreplikation sowohl in den A549- als auch in den HBMEC-Zellen resultierte und dass die Zugabe von exogenem L-Trp zu einer teilweisen Aufhebung des antiviralen Effektes führte.

5.7 Erklärungsversuche für die antivirale Wirkung derIDO

Das Enzym IDO katalysiert die oxidative Spaltung des Indolringes einiger wichtiger regulatorischer Moleküle, insbesondere Tryptophan. Diese As stellt im biologischen Stoffwechsel eine wichtige Rolle dar.

Daher könnte der erste Erklärungsversuch zum IDO-vermittelte Trp Abbau, der die Virusreplikation reduziert, sein, dass Proteine, die zur Virusreplikation notwendig sind, möglicherweise mehr Trp enthalten als die Wirtszellproteine. Durch die Reduktion des vorhandenen Trp könnte die Synthese der Virusproteine vorzugsweise betroffen sein (Adams *et al.*, 2004 a). Man findet zum Beispiel im Transmembranglykoprotein gp41 des HIV eine Membran-proximale Trp-reiche Region, die eine entscheidende Bedeutung in der Membranfusion einnimmt (Schibli *et al.*, 2001). Ferner findet man ein Trp Cluster (W398, W402, W406, W414) in der Reversen Transkriptase des HIV. Diese Reverse Transkriptase fungiert als Heterodimer (p51/p66) und das Trp Wiederholungsmotiv in der Untereinheit p51 spielt eine wichtige Rolle in der Interaktion und Stabilität der beiden Untereinheiten. Die Spaltung dieser Interaktion der beiden Untereinheiten könnte als möglicher Angriffspunkt für antivirale Medikamente dienen (Mulky *et al.*, 2005).

Ein zweiter Erklärungsversuch wäre, dass eine reduzierte Menge an verfügbaren Trp oder auch erhöhte Konzentrationen an Tryptophanmetaboliten ein Gefahrensignal in den Zellen darstellen und somit den Wirtszellstoffwechsel stören könnten (Adams *et al.*, 2004 a). Im Kynureninstoffwechselweg findet man als Tryptophan-metabolit Quinolinsäure (QUIN). QUIN ist als Neurotoxin in einigen neuro-degenerativen Erkrankungen wie Alzheimer (Widner *et al.*, 2002), Huntington-Krankheit (Beal *et al.*, 1986, Schwarcz *et al.*, 1988) und AIDS Demenzkomplex (Heyes *et al.*, 1989, 1991) beteiligt und stimuliert die N-Methyl-D-Aspartat(NMDA)-Typ Glutamat-Rezeptoren (Perkins & Stone, 1983).

Ein dritter Erklärungsversuch zur antiviralen Funktion der IDO kann genannt werden, dass das Zellwachstum und die Stabilität einzelner mRNAs durch die Abbauprodukte der Aminosäure Trp beeinflusst werden (Adams *et al.*, 2004 a,b). Van Wissen *et al.* konnten zeigen, dass eine Depletion von Trp zu einer Stabilisierung der IL-6 und IL-8 mRNA in Lungenepithelzelllinien führt (van Wissen *et al.*, 2002).

5.8 Biologische Bedeutung der IDO-Induktion

Wenn infektiöse Erreger ins Gewebe eindringen, dann sammeln sich Leukozyten und Lymphozyten am Infektionsort an und entlassen Interferone in das entzündete Milieu. IFN- γ agiert an spezifischen Rezeptoren und bewirkt eine IDO-Induktion in den gleichen und in anderen Zellarten. Dies inhibiert wiederum das Wachstum der Viren, Bakterien und Parasiten, da nur wenig Trp als essentielle AAs für deren Wachstum verfügbar ist (Grohmann *et al.*, 2003).

Obwohl IDO zum ersten Mal schon 1963 im Kaninchendarm beschrieben wurde (Higuchi *et al.*, 1963) und die antimikrobielle Resistenz schon seit etlichen Jahren bekannt ist, wurde erst in den letzten Jahren die biologische Bedeutung der IDO-Induktion in einem breiteren Spektrum untersucht (Taylor & Feng, 1991; Hayaishi, 1993; Mellor & Munn, 1999).

Säugetiere verdanken ihre Existenz immunsupprimierenden Prozessen, welche fetale Abstoßungen im Uterus verhindern. Pionierarbeit leisteten Mellor & Munn, indem sie IDO-exprimierenden Zellen eine Regulation im Bezug auf maternale T-Zell-Immunität während einer Schwangerschaft zuwies (Mellor & Munn, 1999). Wird der Trp-Katabolismus während der murinen Schwangerschaft blockiert, ermöglicht es den maternalen T-Zellen eine fetale Allograft-Abstoßung hervorzurufen (Munn *et al.*, 1998). Dies lieferte einen starken Beweis, dass die Zellen der Plazenta IDO synthetisieren, um den Fetus vor einem maternalen T-Zell-Angriff zu schützen.

IDO wird von IFN- γ in den meisten Zellen induziert und Trp ist ein unentbehrlicher Bestandteil verschiedenster Proteine. Diese Aminosäure repräsentiert eine Quelle für zwei sehr wichtige biochemische Stoffwechselwege. Die Bildung von 5-Hydroxytryptamine (Serotonin, ein Vasoconstrictor und Neurotransmitter, der durch IDO abgebaut wird) und die IDO-katalysierende Bildung von einer Serie biologisch aktiver Metabolite verweist auf die Kynurenine.

Der Tryptophan-Katabolismus spielt auch eine entscheidende Rolle bei der Kontrolle der Konzentrationen wichtiger regulatorischer Moleküle. Die IDO-Aktivität könnte vor allem verschiedene physiopathologische Prozesse beeinflussen. Zum Beispiel wird erhöhter Trp-Abbau als begleitender Vorgang mit zellulärer Immunaktivierung oder Dysfunktion beobachtet. Daher könnte im Zustand persistierender Immunaktivierung

erhöhter Tryptophan Katabolismus zur Depletion von freiem Trp im Serum und zur Akkumulierung neuroaktiver Kynureninmetabolite führen. Als Folge werden wahrscheinlich serotonergische Funktionen beeinflusst. Die neurotoxischen Eigenschaften der Kynureninderivate führen dann möglicherweise noch zu Störungen, die neurologische oder psychiatrische Symptome hervorrufen (Widner *et al.*, 2002).

Eine *in vivo* Studie (Depboylu *et al.*, 2004) der Gruppe von Prof. Weihe aus Marburg zeigt deutlich, welche Rolle IDO und auch QUIN in der Ätiologie der lentiviralen Enzephalopathie spielen. Sie untersuchten die Biosynthese von IDO in Gehirnen von Affen, die mit dem Affen-Immundefizienzvirus (SIV) infiziert und schließlich an AIDS erkrankt waren.



Abbildung 5.1: IDO-Expression an der Blut-Hirn-Schranke von Affen mit AIDS (verändert nach Depboylu *et al.*, 2004).

Sie konnten sehr beeindruckend veranschaulichen, dass das IDO-Protein in den Gehirnen der Affen, die an neuro-AIDS litten, exprimiert war und dass diese Induktion durch die Behandlung mit 6-Chlor-2',3'-Dideoxyguanosin, einem antiretroviralen Mittel, (Shirasaka *et al.*, 1990) supprimiert werden konnte.

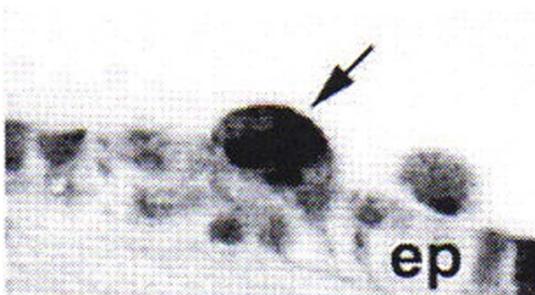


Abbildung 5.2: IDO-positive mehrkernige Riesenzelle (Pfeil), die an der Oberfläche der Ependymzellen (ep) liegt (verändert nach Depboylu *et al.*, 2004)

Die Abbildungen 5.1 und 5.2 zeigen dieIDO-Expression in Monozyten, die sich an der Oberfläche der Gehirndothelzellen befinden. Diese Bilder zeigen, dass dieIDO-Synthese möglicherweise eine entscheidende Rolle im Zuge der Überwindung der Blut-Hirn-Schranke (BHS) spielt. Daher wäre es interessant zu wissen, ob die MV ebenfalls in MonozytenIDO induzieren könnten, um Vorgänge an der BHS zu beeinflussen.

In der Abbildung 4.27 wurde auch dieIDO-Aktivität im Bezug auf eine HSV-1-Infektion untersucht. Besonders hervorzuheben ist, dass die Stimulierung der HBMECs mit ansteigenden Konzentrationen an IFN- γ eine Dosis-abhängige Reduktion des ICP-0-Proteins des HSV-1 zur Folge hatte. Jedoch ließ sich keinIDO-Protein im Western-Blot detektieren.

Die Herpes-Simplex-Viren sind weltweit verbreitet und mehr als 90 Prozent aller Erwachsenen sind mit ihnen infiziert (Whitley & Roizman, 2001). Die Primärinfektion mit dem Herpes-Simplex-Virus Typ 1 erfolgt meist asymptomatisch in jungen Jahren. Die HSV-1 Prävalenz beim Menschen steigert sich allmählich von der Kindheit bis zum Erreichen von 60 Jahren auf 80 %. Die wohl schwerwiegendste Infektion, die durch HSV-1 verursacht wird, ist die sporadische Enzephalitis. Diese zeichnet sich durch eine unbehandelte Mortalitätsrate von nahezu 70% aus (Whitley, 1981; Kleinschmidt-DeMasters & Gilden, 2001). Im Gegensatz dazu wird das Herpes-Simplex-Virus Typ 2 vorwiegend durch Genitalsekrete bei Sexualkontakten übertragen, findet man HSV-2-Antikörper auch vor der Sexualreife (Adam *et al.*, 1979). Herpesvirus-Infektionen im Genitalbereich stellen bei Schwangeren ein großes Problem dar, weil während der Entbindung der Erreger auf das Neugeborene übertragen werden kann. In 60 bis 75% der Fälle kann dies nach der Geburt zu einer Enzephalitis führen. Aseptische Meningitis ist eine häufige Komplikation bei Menschen mit einer primären genitalen HSV-2 Infektion (Francis *et al.*, 1975; Whitley *et al.*, 1988).

Betrachtet man die Ergebnisse, dass bei einer HSV-1 Infektion mit einer gleichzeitigen IFN- γ -Stimulation in HBMECs keinIDO synthetisiert wird, so stellt sich die Frage, obIDO in diesem Zusammenhang eine antivirale Aktivität aufweisen kann oder ob HSV-1 die IFN- γ -vermittelteIDO-Induktion in irgendeiner Weise hemmen und damit die Vorgänge an der Blut-Hirn (Organ)-Schranke möglicherweise beeinflussen kann.

Abschließend kann man zusammenfassend auflisten, dass die IDO-Aktivität in folgenden Punkten mitwirkt:

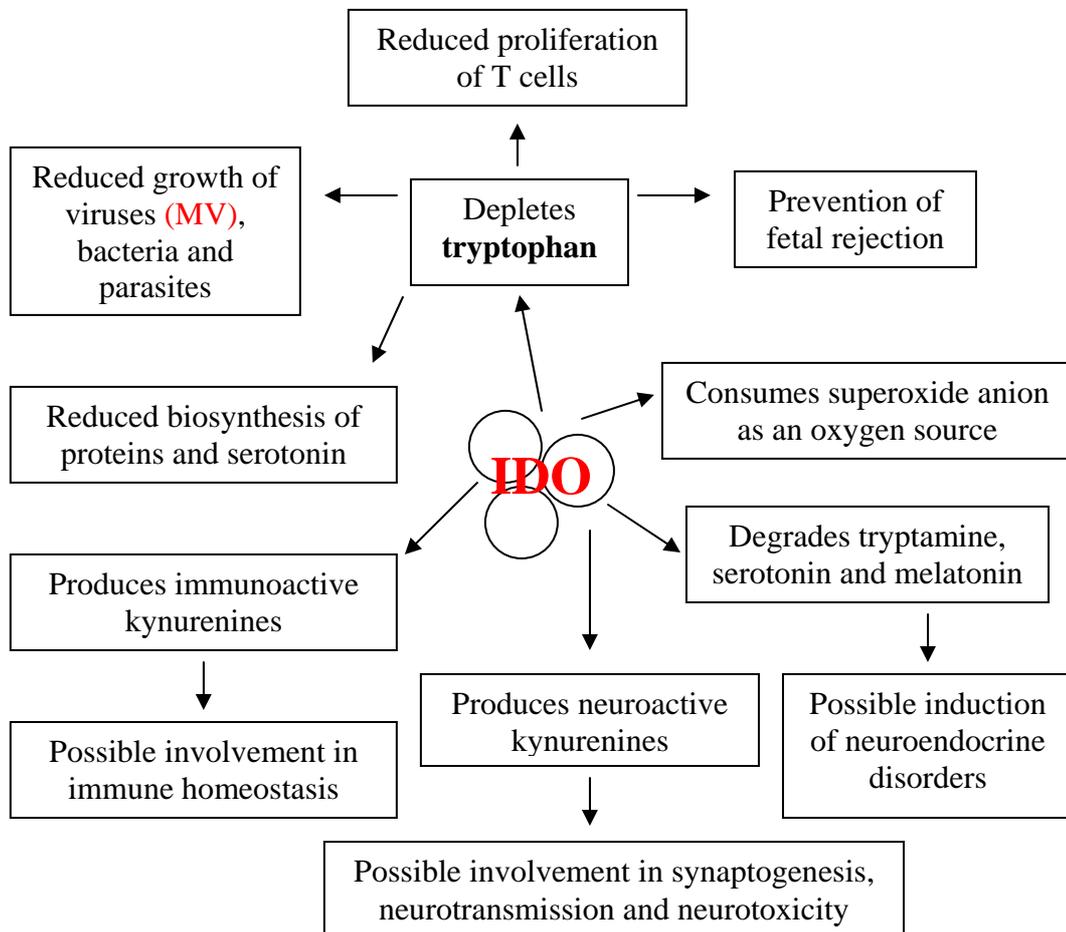


Abbildung 5.3: Die Vielfältigkeit der Effekte der IDO-Induktion und die mögliche Rolle bei physiopathologischen Bedingungen (verändert nach Grohmann *et al.*, 2003).

6 Zusammenfassung

Das Masernvirus (MV) gehört zu den negativ-strängigen RNA-Viren der Familie der *Paramyxoviridae* und verursacht beim Menschen akute und subakute Enzephalitiden. Es wurde beschrieben, dass sich MV-RNA in den Endothelzellen von SSPE (subakute sklerosierende Panenzephalitis)-Gehirnen nachweisen lässt (Cosby & Brankin, 1995). In dieser Arbeit konnte ich eine CD46- und CD150-unabhängige Infektion von Endothelzellen durch Wildtyp-MV nachweisen.

Ferner wurde beschrieben, dass das Typ II-Interferon (IFN- γ) im Serum von Patienten mit akuten Masern und nach einer Masernimpfung erhöht ist (Okada *et al.*, 2001; Ovsyannikova *et al.*, 2003) und dieses Zytokin lässt sich auch in Gehirnläsionen von SSPE-Patienten detektieren (Nagano *et al.*, 1994). Basierend auf diesen Erkenntnissen, konnte ich eine durch das Enzym Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) vermittelte antivirale Aktivität von IFN- γ gegen MV nachweisen.

Endothelzellen (EZ) sind bei der akuten Masernerkrankung oder nachfolgenden Komplikationen, die auf einer persistierenden Infektion basieren, wichtige Zielzellen. CD46 und CD150 (signalling lymphocytic activation molecule, SLAM) wurden als zelluläre Rezeptoren für MV beschrieben (Dörig *et al.*, 1993; Naniche *et al.*, 1993; Tatsuo *et al.*, 2000). Es konnte gezeigt werden, dass humane EZ aus dem Gehirn und aus der Nabelschnurvene (HBMECs und HUVECs) zwar CD46, aber auf RNA- und auf Proteinebene kein SLAM exprimieren. Diese Zellen konnten jedoch mit den Wildtyp-MV, die CD46 nicht als Rezeptor benutzen, infiziert werden.

Diese Untersuchungen deuten auf die Präsenz eines zusätzlichen Rezeptors für die Aufnahme und Verbreitung von MV in humanen EZ hin.

Der antivirale Effekt von Interferonen spielt bei der MV-Vermehrung eine entscheidende Rolle und variiert jedoch in Abhängigkeit von der Wirtszelle (Schnorr *et al.*, 1993). Im Gegensatz zu den attenuierten MV-Impfstämmen können Wildtyp-MV den antiviralen Effekt von Typ I-IFN blockieren, indem sie die Induktion von IFN α/β

hemmen und die Sensivität gegenüber dem antiviralen Effekt vermindern. Dabei spielen die V- und C-Proteine des MV eine Rolle (Naniche *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2000; Shaffer *et al.*, 2003), die mit zellulären STAT-Proteinen und IRF-9 interagieren (Palosaari *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2003; Yokota *et al.*, 2003).

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass IFN- γ die Replikation aller MV-Stämme vorwiegend in Endo- und Epithelzellen hemmen kann und, dass diese durch IFN- γ induzierte, antivirale Aktivität mit der Induktion der Indolamin 2,3-Dioxygenase (IDO) korreliert. IDO ist ein Enzym, welches in Anwesenheit von Sauerstoff den Abbau von Tryptophan zu Kynurenin katalysiert (Hirata *et al.*, 1975) und hauptsächlich antiparasitäre, antibakterielle und antivirale (Bodaghi *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2004) Effekte vermittelt. Im Zusammenhang mit Masern wurde beschrieben, dass die Tryptophan Katabolite in SSPE-Patienten erhöht sind (Kurup & Kurup, 2002).

Die Daten in dieser Arbeit zeigen, dass die durch IFN- γ -induzierte antivirale Aktivität durch Zugabe von L-Tryptophan nahezu aufgehoben werden kann und daher IDO im Zuge der anti-MV Aktivität eine entscheidende Rolle spielt.

7 Summary

Measles virus (MV) belongs to the negative-stranded RNA-viruses of the family *Paramyxoviridae* and causes acute and subacute encephalitis in humans.

It has been described that MV-RNA can be detected in endothelial cells of SSPE (subacute sclerosing panencephalitis)-brains (Cosby & Brankin, 1995). In this work I could show a CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses.

Furthermore it has been described that after acute infections and vaccinations, the type II-interferon (IFN- γ) concentrations are increased (Okada *et al.*, 2001; Ovsyannikova *et al.*, 2003) and this cytokine can also be detected in brain lesions of patients suffering from SSPE (Nagano *et al.*, 1994). Based upon this findings I could detect an indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mediated anti-MV activity of gamma interferon.

Endothelial cells (ECs) are important target cells during acute measles and complications following the infection. CD46 and CD150 (signalling lymphocytic activation molecule, SLAM) have been described as cellular receptors for MV (Dörig *et al.*, 1993; Naniche *et al.*, 1993; Tatsuo *et al.*, 2000). It has been shown that human ECs from brain and umbilical vein (HBMECs and HUVECs) were CD46-positive, but did not express SLAM neither at RNA- nor at protein level. However, these cells could be infected with the wild-type MV strains, which do not use CD46 as a receptor.

These findings suggest the presence of an additional receptor for MV uptake and spread in human ECs.

The antiviral effect of interferons plays an important role for the MV-replication. However, this effect depends from the host cell (Schnorr *et al.*, 1993). Attenuated MV strains are more sensitive to type I-interferons than wild-type strains, because wild-type strains can block the induction of IFN- α/β . The V- and C-proteins of MV play a role in this process (Naniche *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2000; Shaffer *et al.*, 2003). They

interact with STAT proteins and IRF-9 (Palosaari *et al.*, 2003; Takeuchi *et al.*, 2003; Yokota *et al.*, 2003).

In this work it could be shown, that IFN- γ can inhibit the replication of all MV strains preferably in endo- and epithelial cells. Furthermore it could be demonstrated that the antiviral activity induced by IFN- γ correlates with the induction of IDO. IDO is an enzyme which in the presence of oxygen catalyses the degradation of tryptophan (Hirata *et al.*, 1975) and is known to mediate antiparasitic as well as antibacterial and antiviral effects (Bodaghi *et al.*, 1999; Adams *et al.*, 2004). In the context with measles it has been described that the tryptophan catabolites were increased in SSPE-patients (Kurup & Kurup, 2002).

The data in this work show that the IFN- γ -induced antiviral activity can be overcome by the addition of L-tryptophan which indicates a decisive role of IDO in the anti-MV activity.

8 Literaturverzeichnis

A

Allen, I.V., McQuaid, S., McMahon, J., Kirk, J. and McConnell, R. 1996. The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol.* 55:471-480.

Adam, E., Kaufman, R.H., Mirkovic, R.R. and Melnick, J.L. 1979. Persistence of virus shedding in asymptomatic women after recovery from herpes genitalis. *Obstet Gynecol.* 54(2):171-173.

Adams, O., Besken, K., Oberdorfer, C., MacKenzie, C.R., Takikawa, O. and Daubener, W. 2004 a. Role of indoleamine-2,3-dioxygenase in alpha/beta and gamma interferon-mediated antiviral effects against herpes simplex virus infections. *J Virol.* 78(5):2632-2636.

Adams, O., Besken, K., Oberdorfer, C., MacKenzie, C.R., Russing, D. and Daubener, W. 2004 b. Inhibition of human herpes simplex virus type 2 by interferon gamma and tumor necrosis factor alpha is mediated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *Microbes Infect.* 6(9):806-812.

Aguet, M. and Merlin, G. 1987. Purification of human gamma interferon receptors by sequential affinity chromatography on immobilized monoclonal antireceptor antibodies and human gamma interferon. *J Exp Med.* 165(4):988-999.

Alcami, A. and Koszinowski, U.H. 2000. Viral mechanisms of immune evasion. *Immunol. Today.* 21:447-455.

Andres, O., Obojes, K., Kim, K.S., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. 2003. CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wildtype measles viruses. *J Gen Virol.* 84:1189-1197.

Andrews, P.W., Damjanov, I., Simon, D., Banting, G.S., Carlin, C., Dracopoli, N.C. and Fogh, J. 1984. Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest.* 1984 Feb;50(2):147-162.

Anlar, B., Kose, G., Gurer, Y., Altunbasak, S., Haspolat, S. and Okan, M. 2001 a. Changing epidemiological features of subacute sclerosing panencephalitis. *Infection* 29(4):192-195.

Anlar, B., Soylemezoglu, F., Aysun, S., Kose, G., Belen, D. and Yalaz, K. 2001 b. Tissue inflammatory response in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *J Child Neurol.* 16(12):895-900.

Arnheiter, H. and Haller, O. 1983. Mx gene control of interferon action: different kinetics of the antiviral state against influenza virus and vesicular stomatitis virus. *J Virol.* Sep;47(3):626-630.

Arnheiter, H. and Meier, E. 1990. Mx proteins: antiviral proteins by chance or by necessity? *New Biol.* 2(10):851-857.

Astier, A., Trescol-Biemont, M.C., Azocar, O., Lamouille, B. and Rabourdin-Combe, C. 2000. Cutting edge: CD46, a new costimulatory molecule for T cells, that induces p120CBL and LAT phosphorylation. *J Immunol.* 164(12):6091-6095.

Atkinson, W. L., Orenstein, W. A., and Krugman, S. 1992. The resurgence of measles in the United States, 1989-1990. *Annu. Rev. Med.* 43:451-463.

Attibele, N., Wyde, P.R., Trial, J., Smole, S.C., Smith, C.W. and Rossen, R.D. 1993. Measles virus-induced changes in leukocyte function antigen 1 expression and leukocyte aggregation: possible role in measles virus pathogenesis. *J Virol.* 67(2):1075-1079.

Aune, T.M. and Pogue, S.L. 1989. Inhibition of tumor cell growth by interferon-gamma is mediated by two distinct mechanism dependent upon oxygen tension: induction of tryptophan degradation and depletion of intracellular nicotinamide adenine dinucleotide. *J Clin Invest* 84:863-875.

Aversa, G., Carballido, J., Punnonen, J., Chang, C.C., Hauser, T., Cocks, B.G. and De Vries, J.E. 1997. SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses. *Immunol Cell Biol.* 75(2):202-205.

B

Bach, E.A., Aguet, M. and Schreiber, R.D. 1997. The IFN gamma receptor: a paradigm for cytokine receptor signaling. *Annu Rev Immunol.* 15:563-591.

Bartz, R., Brinckmann, U., Dunster, L. M., Rima, B., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. 1996. Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *J. Virol.* 224:334-337.

Beal, M.F., Kowall, N.W., Ellison, D.W., Mazurek, M.F., Swartz, K.J. and Martin, J.B. 1986. Replication of the neurochemical characteristics of Huntington's disease by quinolinic acid. *Nature.* 321(6066):168-171.

Bellini, W.J., Englund, G., Rozenblatt, S., Arnheiter, H., and Richardson, C.D. 1985. Measles virus P gene codes for two proteins. *J. Virol.* 53:908-919.

de Benedetti, A. and Baglioni, C. 1984. Inhibition of mRNA binding to ribosomes by localized activation of dsRNA-dependent protein kinase. *Nature* 311(5981):79-81.

Bianchi, M., Bertini, R. and Ghezzi, P. 1988. Induction of Indoleamine dioxygenase by interferon in mice: a study with different recombinant interferons and various cytokines. *Biochem Biophys Res Commun* 152:237-242.

- Biedler, J.L., Helson, L. and Spengler, B.A. 1973.** Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res.* 33(11):2643-2652.
- Billeter, M.A., Cattaneo, R., Spielhofer, P., Kaelin, K., Huber, M., Schmid, A., Bacsko, K. and ter Meulen, V. 1994.** Generation and properties of measles virus mutations typically associated with subacute sclerosing panencephalitis. *Ann N Y Acad Sci.* 724:367-377.
- Billiau, A. 1996 a.** Interferon-gamma in autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev.* 7(1):25-34.
- Billiau, A. 1996 b.** Interferon-gamma: biology and role in pathogenesis. *Adv Immunol.* 62:61-130.
- Binder, G.K. and Griffin, D.E. 2001.** Interferon-gamma-mediated sitespecific clearance of alphavirus from CNS neurons. *Science.* 293:303-306.
- Biron, C.A. 1997.** Natural killer cell regulation during viral infection. *Biochem Soc Trans.* 25(2):687-690.
- Bitnun, A., Shannon, P., Durward, A., Rota, P.A., Bellini, W.J., Graham, C., Wang, E., Ford-Jones, E.L., Cox, P., Becker, L., Fearon, M., Petric, M. and Tellier, R. 1999.** Measles inclusion-body encephalitis caused by the vaccine strain of measles virus. *Clin Infect Dis.* 29(4):855-861.
- Black, R.A. 2002.** Tumor necrosis factor-alpha converting enzyme. *Int J Biochem Cell Biol.* 2002 Jan;34(1):1-5.
- Bleharski, J.R., Niazi, K.R., Sieling, P.A., Cheng, G. and Modlin, R.L. 2001.** Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol.* 167(6):3174-3181.
- Blumberg, B.M., Leppert, M. and Kolakofsky, D. 1981.** Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell* 23(3):837-845.
- Bodaghi, B., Goureau, O., Zipeto, D., Laurent, L., Virelizier, J.L. and Michelson, S. 1999.** Role of IFN-gamma-induced indoleamine 2,3 dioxygenase and inducible nitric oxide synthase in the replication of human cytomegalovirus in retinal pigment epithelial cells. *J Immunol.* 162(2):957-964.
- Bode, J. and Hauser, H. 1990.** Biologische Wirkung und Induktionsmechanismen der Interferone. Carl Hanser Verlag, München: 63-100.
- Bocci, V. 1988.** Renal catabolism of interferons, interleukins 1 and 2 and tumor necrosis factor. *Contrib Nephrol.* 68:53-57.
- Bogdan, C. 2001.** Nitric oxide and the immune response. *Nat Immunol.* 2(10):907-916.
- Brown, R.E., Jarvis, K.L. and Hyland, K.J. 1989.** Protein measurement using bicinchoninic acid: elimination of interfering substances. *Anal Biochem.* 180(1):136-139.

Buchholz, C.J., Gerlier, D., Hu, A., Cathomen, T., Liszewski, M.K., Atkinson, J.P. and Cattaneo, R. 1996. Selective expression of a subset of measles virus receptor-competent CD46 isoforms in human brain. *Virology* 217(1):349-355.

Buchholz, C.J., Koller, D., Devaux, P., Mumenthaler, C., Schneider-Schaulies, J., Braun, W., Gerlier, D. and Cattaneo, R. 1997. Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J Biol Chem.* 272(35):22072-22079.

Buchholz, C.J., Schneider, U., Devaux, P., Gerlier, D. and Cattaneo, R. 1996. Cell entry by measles virus: long hybrid receptors uncouple binding from membrane fusion. *J Virol.* 70(6):3716-3723.

Burudi, E.M.E., Marcondes, C.G., Watry, D.D., Zandonatti, M., Taffe, M.A. and Fox, H.S. 2002. Regulation of indoleamine 2,3-dioxygenase expression in simian immunodeficiency virus-infected monkey brains. *J Virol.* 76:12233-12241.

Byrne, G.I., Lehmann, L.K. and Landry, G.J. 1986. Induction of tryptophan catabolism is the mechanism for gamma-interferon-mediated inhibition of intracellular *Chlamydia psittaci* replication in T24 cells. *Infect Immun.* 53(2):347-351.

C

Cantin, E., Tanamachi, B. and Openshaw, H. 1999. Role for gamma interferon in control of herpes simplex virus type I reactivation. *J Virol.* 73:3418-3423.

Carballido, J.M., Aversa, G., Kaltoft, K., Cocks, B.G., Punnonen, J., Yssel, H., Thestrup-Pedersen, K. and de Vries, J.E. 1997. Reversal of human allergic T helper 2 responses by engagement of signaling lymphocytic activation molecule. *J Immunol.* 159(9):4316-4321.

Carlin, J.M., Borden, E.C., Sondel, P.M. and Byrne, G.I. 1987. Biological response modifier-induced indoleamine 2,3-dioxygenase activity in human peripheral blood mononuclear cell cultures. *J Immunol* 139:2414-2418.

Carpick, B.W., Graziano, V., Schneider, D., Maitra, R.K., Lee, X. and Williams, B.R. 1997. Characterization of the solution complex between the interferon-induced, double-stranded RNA-activated protein kinase and HIV-I trans-activating region RNA. *J Biol Chem.* 272(14):9510-9516.

Casasnovas, J.M., Larvie, M. and Stehle, T. 1999. Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus-binding surface. *EMBO J.* 18(11):2911-2922.

Castelli, J.C., Hasel, B.A., Maran, A., Paranjape, J., Hewitt, J.A., Li, X.L., Hsu, Y.T., Silverman, R.H. and Youle, R.J. 1998. The role of 2'-5' oligoadenylate-activated ribonuclease L in apoptosis. *Cell Death Differ* 5(4):313-320.

Cattaneo, R. 2004. Four viruses, two bacteria, and one receptor: membrane cofactor protein (CD46) as pathogens' magnet. *J Virol.* 78(9):4385-4388.

- Cattaneo, R. and Billeter, M.A. 1992.** Mutations and A/I hypermutations in measles virus persistent infections. *Curr Top Microbiol Immunol.* 176:63-74.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Baczko, K., ter Meulen, V. and Billeter, M.A. 1987.** Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology* 160(2):523-526.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Baczko, K., ter Meulen, V. and Billeter, M.A. 1987.** Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *EMBO J.* 6(3):681-688.
- Cattaneo, R., Schmid, A., Eschle, D., Baczko, K., ter Meulen, V. and Billeter, M.A. 1988.** Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* 55(2):255-265.
- Cebulla, C.M., Miller, D.M. and Sedmak, D.D. 1999.** Viral inhibition of interferon signal transduction. *Intervirology.* 42:325-330.
- Centers for Disease Control and Prevention (CDC). 2003.** Measles epidemic attributed to inadequate vaccination coverage—Campania, Italy, 2002. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 31;52(43):1044-1047.
- Chesler, D.A. and Reiss, C.S. 2002.** The role of IFN-gamma in immune responses to viral infections of the central nervous system. *Cytokine Growth Factor Rev.* 13(6):441-454.
- Choudhary, S., Gao, J., Leaman, D.W. and De, B.P. 2001.** Interferon action against human parainfluenza virus type 3: involvement of a novel antiviral pathway in the inhibition of transcription. *J Virol.* 75:4823-4831.
- Clemens, M.J. 1997.** PKR--a protein kinase regulated by double-stranded RNA. *Int J Biochem Cell Biol.* 1997 Jul;29(7):945-949.
- Clemens, M.J. and Elia, A. 1997.** The double-stranded RNA-dependent protein kinase PKR: structure and function. *J Interferon Cytokine Res.* 17(9):503-524.
- Cocks, B.G., Chang, C.C., Carballido, J.M., Yssel, H., de Vries, J.E. and Aversa, G. 1995.** A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* 376(6537):260-263.
- Coffey, A.J., Brooksbank, R.A., Brandau, O., Oohashi, T., Howell, G.R., Bye, J.M., Cahn, A.P., Durham, J., Heath, P., Wray, P., Pavitt, R., Wilkinson, J., Leversha, M., Huckle, E., Shaw-Smith, C.J., Dunham, A., Rhodes, S., Schuster, V., Porta, G., Yin, L., Serafini, P., Sylla, B., Zollo, M., Franco, B., Bentley, D.R., et al. 1998.** Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet.* 20(2):129-135.
- Colamonici, O.R., Uyttendaele, H., Domanski, P., Yan, H. and Krolewski, J.J. 1994 a.** p135tyk2, an interferon-alpha-activated tyrosine kinase, is physically associated with an interferon-alpha receptor. *J Biol Chem.* 269(5):3518-3522.

Colamonici, O., Yan, H., Domanski, P., Handa, R., Smalley, D., Mullersman, J., Witte, M., Krishnan, K. and Krolewski, J. 1994 b. Direct binding to and tyrosine phosphorylation of the alpha subunit of the type I interferon receptor by p135tyk2 tyrosine kinase. *Mol Cell Biol.* 14(12):8133-8142.

Colasanti, M., Persichini, T., Cavalieri, E., Fabrizi, C., Mariotto, S., Menegazzi, M., Lauro, G.M. and Suzuki, H. 1999. Rapid inactivation of NOS-I by lipopolysaccharide plus interferon-gamma-induced tyrosine phosphorylation. *J Biol Chem.* 274(15):9915-9917.

Cole, J.L., Housley, G.A. Jr., Dykman, T.R., MacDermott, R.P. and Atkinson, J.P. 1985. Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 82(3):859-863.

Cosby, S.L. and Brankin, B. 1995. Measles virus infection of cerebral endothelial cells and effect on their adhesive properties. *Vet Microbiol.* 1995 May;44(2-4):135-139.

Crespi, M., Chiu, M.N., Schoub, B.D. and Lyons, S.F. 1986. Effect of interferon on Vero cells persistently infected with SSPE virus and lytically infected with measles virus. *Arch Virol.* 90(1-2):87-96.

D

Dai, W., Pan, H., Kwok, O. and Dubey, J.P. 1994. Human indoleamine 2,3-dioxygenase inhibits *Toxoplasma gondii* growth in fibroblast cells. *J Interferon Res.* 14(6):313-317.

Darnell, J.E.Jr. 1997. STATs and gene regulation. *Science.* 277(5332):1630-1635.

Däubener, W., Pilz, K., Seghrouchni Zennati, S., Bilzer, T., Fischer, H.G. and Hadding, U. 1993. Induction of toxoplasmosis in a human glioblastoma by interferon gamma. *J Neuroimmunol.* 43(1-2):31-38.

Däubener, W., Posdziech, V., Hadding, U. and MacKenzie, C.R. 1999. Inducible anti-parasitic effector mechanisms in human uroepithelial cells: tryptophan degradation vs. NO production. *Med Microbiol Immunol. (Berlin)* 187(3):143-147.

Däubener, W., Spors, B., Hucke, C., Adam, R., Stins, M., Kim, K.S. and Schrotten, H. 2001. Restriction of *Toxoplasma gondii* growth in human brain microvascular endothelial cells by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* 69(10):6527-6531.

Däubener, W., Wanagat, N., Pilz, K., Seghrouchni, S., Fischer, H.G. and Hadding, U. 1994. A new, simple, bioassay for human IFN-gamma. *J Immunol Methods* 168:39-47.

Depboylu, C., Reinhart, T.A., Takikawa, O., Imai, Y., Maeda, H., Mitsuya, H., Rausch, D., Eiden, L.E. and Weihe, E. 2004. Brain virus burden and indoleamine-2,3-dioxygenase expression during lentiviral infection of rhesus monkey are concomitantly lowered by 6-chloro-2',3'-dideoxyguanosine. *Eur J Neurosci.* 19(11):2997-3005.

- Derynck, R., Content, J., DeClercq, E., Volckaert, G., Tavernier, J., Devos, R. and Fiers, W. 1980 a.** Isolation and structure of a human fibroblast interferon gene. *Nature* 285(5766):542-547.
- Derynck, R., Remaut, E., Saman, E., Stanssens, P., De Clercq, E., Content, J. and Fiers, W. 1980 b.** Expression of human fibroblast interferon gene in *Escherichia coli*. *Nature* 287(5779):193-197.
- Detels, R., Brody, J.A., McNew, J. and Edgar, A.H. 1973.** Further epidemiological studies of subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet* 2(7819):11-14.
- Devaux, P., and Cattaneo, R. 2004.** Measles virus phosphoprotein gene products: Conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *J Virol.* 78:11632-11640.
- Devaux, P., Loveland, B., Christiansen, D., Milland, J. and Gerlier, D. 1996.** Interactions between the ectodomains of haemagglutinin and CD46 as a primary step in measles virus entry. *J Gen Virol.* 77 (Pt 7):1477-1481. Erratum in: *J Gen Virol Dec;77(Pt 12):3165.*
- Dhiman, N., Jacobson, R.M. and Poland, G.A. 2004.** Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Rev Med Virol.* 14(4):217-229.
- Diaz-Guerra, M., Rivas, C. and Esteban, M. 1997.** Inducible expression of the 2-5A synthetase/RNase L system results in inhibition of vaccinia virus replication. *Virology* 227(1):220-228.
- Djeu, J.Y., Blanchard, D.K., Halkias, D. and Friedman, H. 1986.** Growth inhibition of *Candida albicans* by human polymorphonuclear neutrophils: activation by interferon-gamma and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 137(9):2980-2984.
- Dong, B. and Silverman, R.H. 1997.** A bipartite model of 2-5A-dependent RNase L. *J Biol Chem.* 272(35):22236-22242.
- Dorig, R.E., Marcil, A., Chopra, A., and Richardson, C.D. 1993.** The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston-strain). *Cell* 22;75(2):295-305.
- Duclos, P. and Ward, B.J. 1998.** Measles vaccines: a review of adverse events. *Drug Saf.* 19(6):435-454.
- Duke, T. and Mgone, C.S. 2003.** Measles: not just another viral exanthem. *Lancet* 361(9359):763-773.
- Duprex, W.P., McQuaid, S., Hangartner, L., Billeter, M.A. and Rima, B.K. 1999.** Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J Virol.* 73(11):9568-9575.
- Dworkin-Rastl, E., Dworkin, M.B., Swetly, P. 1982.** Molecular cloning of human alpha and beta interferon genes from Namalwa cells. *J Interferon Res.* 2(4):575-585.

E

Emeny, J.M. and Morgan, M.J. 1979. Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. *J Gen Virol.* 43(1):247-252.

Erlenhoefler, C., Wurzer, W.J., Loffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. 2001. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* 75(10): 4499-44505.

Escoffier, C., Manie, S., Vincent, S., Muller, C. P., Billeter, M., and Gerlier, D. 1999. Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J Virol.* 73:1695-1698.

Esolen, L.M., Takahashi, K., Johnson, R.T., Vaisberg, A., Moench, T.R., Wesselingh, S.L. and Griffin, D.E. 1995. Brain endothelial cell infection in children with acute fatal measles. *J Clin Invest.* 96:2478-2481.

Esolen, L.M., Ward, B.J., Moench, T.R. and Griffin, D.E. 1993. Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis.* 168(1):47-52.

F

Farrar, J.J. 1999. Nipah-virus encephalitis—investigation of a new infection. *Lancet* 354:1222-1223.

Feng, G.S. and Taylor, M.W. 1989. Interferon- γ resistant mutants are defective in the induction of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 86:7144-7148.

Fountoulakis, M. 1992 a. Unfolding intermediates of the extracellular domain of the interferon gamma receptor. *J Biol Chem.* 267(10):7095-7100.

Fountoulakis, M., Zulauf, M., Lustig, A. and Garotta, G. 1992 b. Stoichiometry of interaction between interferon gamma and its receptor. *Eur J Biochem.* 208(3):781-787.

Francis, D.P., Herrmann, K.L., MacMahon, J.R., Chavigny, K.H. and Sanderlin, K.C. 1975. Nosocomial and maternally acquired herpesvirus hominis infections. A report of four fatal cases in neonates. *Am J Dis Child.* 129(8):889-893.

Freeman, A.F., Jacobsohn, D.A., Shulman, S.T., Bellini, W.J., Jaggi, P., de Leon, G., Keating, G.F., Kim, F., Pachman, L.M., Kletzel, M. and Duerst, R.E. 2004. A new complication of stem cell transplantation: measles inclusion body encephalitis. *Pediatrics* 114(5):e6576-60.

Frese, M., Schwarze, V., Barth, K., Krieger, N., Lohmann, V., Mihm, S., Haller, O. and Bartenschlager, R. 2002. Interferon-gamma inhibits replication of subgenomic and genomic hepatitis C virus RNAs. *Hepatology* 35:694-703.

Friedman, R.M. and Vogel, S.N. 1983. Interferons with special emphasis on the immune system. *Adv Immunol.* 34:97-140.

Fujigaki, S., Saito, K., Takemura, M., Maekawa, N., Yamada, Y., Wada, H. and Seishima, M. 2002. L-tryptophan-L-kynurenine pathway metabolism accelerated by *Toxoplasma gondii* infection is abolished in gamma interferon-gene-deficient mice: cross-regulation between inducible nitric oxide synthase and indoleamine-2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* 70(2):779-786.

G

Gaggar, A., Shayakhmetov, D.M. and Lieber, A. 2003. CD46 is a cellular receptor for group B adenovirus. *Nat. Med.* 9, 1408-1412.

Galabru, J. and Hovanessian, A. 1987. Autophosphorylation of the protein kinase dependent on double-stranded RNA. *J Biol Chem.* 262(32):15538-15544.

Galbraith, S.E., Tiwari, A., Baron, M.D., Lund, B.T., Barrett, T. and Cosby, S.L. 1998. Morbillivirus downregulation of CD46. *J Virol.* 72(12):10292-10297.

Garg, R.K. 2002. Subacute sclerosing panencephalitis. *Postgrad Med J.* 78(916):63-70.

Gerlier, D., Loveland, B., Varior-Krishnan, G., Thorley, B., McKenzie, I.F. and Roubourdin-Combe, C. 1994. Measles virus receptor properties are shared by several CD46 isoforms differing in extracellular regions and cytoplasmic tails. *J Gen Virol.* 75 (Pt 9):2163-2171.

Giard, D.J., Aaronson, S.A., Todaro, G.J., Arnstein, P., Kersey, J.H., Dosik, H. and Parks, W.P. 1973. In vitro cultivation of human tumors: establishment of cell lines derived from a series of solid tumors. *J Natl Cancer Inst.* 51(5):1417-1423.

Gindler, J., Tinker, S., Markowitz, L., Atkinson, W., Dales, L. and Papania, M. J. 2004. Acute measles mortality in the United States, 1987-2002. *J Infect Dis.* 1;189 Suppl 1:S69-77.

Goodship, T.H., Liszewski, M.K., Kemp, E.J., Richards, A. and Atkinson, J.P. 2004. Mutations in CD46, a complement regulatory protein, predispose to atypical HUS. *Trends Mol Med.* 10(5):226-231.

Gotoh, B., Komatsu, T., Takeuchi, K. and Yokoo, J. 2001. Paramyxovirus accessory proteins as interferon antagonists. *Microbiol Immunol.* 45(12):787-800.

Grant, R.S., Naif, H., Thuruthyil, S.J., Nasr, N., Littlejohn, T., Takikawa, O. and Kapoor, V. 2000. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in primary human macrophages by human immunodeficiency virus type I is strain dependent. *J Virol.* 74:4110-4115.

Gray, P.W. and Goeddel, D.V. 1982 a. Structure of the human immune interferon gene. *Nature* 298(5877):859-863.

Gray, P.W. and Goeddel, D.V. 1983. Human immune interferon (IFN-gamma) gene sequence and structure. *Basic Life Sci.* 25:35-61.

Gray, P.W., Leung, D.W., Pennica, D., Yelverton, E., Najarian, R., Simonsen, C.C., Derynck, R., Sherwood, P.J., Wallace, D.M., Berger, S.L., Levinson, A.D. and Goeddel, D.V. 1982 b. Expression of human immune interferon cDNA in *E. coli* and monkey cells. *Nature* 295(5849):503-508.

Greenlund, A.C., Schreiber, R.D., Goeddel, D.V. and Pennica, D. 1993. Interferon-gamma induces receptor dimerization in solution and on cells. *J Biol Chem.* 268(24):18103-18110.

Gribaudo, G., Lembo, D., Cavallo, G., Landolfo, S. and Lengyel, P. 1991. Interferon action: binding of viral RNA to the 40-kilodalton 2'-5'-oligoadenylate synthetase in interferon-treated HeLa cells infected with encephalomyocarditis virus. *J Virol.* 65(4):1748-1757.

Griffin, D.E. and Bellini, W.J. 1996. Measles virus. In *Fields Virology*, 3rd edn, pp.1267-1312. Edited by B. N. Fields, D. M. Knipe & P. M. Howley. Philadelphia: Lippincott-Raven.

Grohmann, U., Fallarino, F. and Puccetti, P. 2003. Tolerance, DCs and tryptophan: much about ado about IDO. *Trends Immunol.* 24(5):242-248.

Gupta, S.L., Carlin, J.M., Pyati, P., Dai, W., Pfefferkorn, E.R. and Murphy, M.J. Jr. 1994. Antiparasitic and antiproliferative effects of indoleamine 2,3-dioxygenase enzyme expression in human fibroblasts. *Infect Immun.* 62(6):2277-2284.

H

Habara-Ohkubo, A., Shirahata, T., Takikawa, O. and Yoshida, R. 1993. Establishment of an antitoxoplasma state by stable expression of mouse indoleamine 2,3-dioxygenase. *Infect Immun.* 61(5):1810-1813.

Hahm, B., Arbour, N., Nanche, D., Homann, D., Manchester, M. and Oldstone, M.B. 2003. Measles virus infects and suppresses proliferation of T lymphocytes from transgenic mice bearing human signaling lymphocytic activation molecule. *J Virol.* 77(6):3505-3515.

Haines, G.K. 3rd, Panos, R.J., Bak, P.M., Brown, T., Zielinski, M., Leyland, J. and Radosevich, J.A. 1998. Interferon-responsive protein kinase (p68) and proliferating cell nuclear antigen are inversely distributed in head and neck squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 19(1):52-59.

Hamalainen, H., Meissner, S. and Lahesmaa R. 2000. Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *J Immunol Methods* 242(1-2): 9-19.

Harcourt, B.H., Tamin, A., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Anderson, L.J., Bellini, W.J., and Rota, P.A. 2000. Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology* 271:334-349.

Harris, N., Buller, R.M. and Karupiah, G. 1995. Gamma interferon-induced, nitric oxide-mediated inhibition of vaccinia virus replication. *J Virol.* 69(2):910-915.

Harty, R.N., and Palese, P. 1995. Measles virus phosphoprotein (P) requires the NH₂- and COOH-terminal domains for interactions with the nucleoprotein (N) but only the COOH terminus for interactions with itself. *J. Gen. Virol.* 76:2863-2867.

Hashimoto, K., Ono, N., Tatsuo, H., Minagawa, H., Takeda, M., Takeuchi, K. and Yanagi, Y. 2002. SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol.* 76:6743-6749.

Hayaishi, O. 1993. My life with tryptophan – never a dull moment. *Protein Sci.* 2:472-475.

Hayaishi, O., Hirata, F., Fujiwara, M., Senoh, S. and Tokuyama, T. 1975. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Note II. Biological function. *Acta Vitaminol Enzymol.* 29(1-6):291-293.

Heyes, M.P., Brew, B.J., Martin, A., Price, R.W., Salazar, A.M., Sidtis, J.J., Yergey, J.A., Mouradian, M.M., Sadler, A.E., Keilp, J., et al. 1991. Quinolinic acid in cerebrospinal fluid and serum in HIV-1 infection: relationship to clinical and neurological status. *Ann Neurol.* 29(2):202-209.

Heyes, M.P., Rubinow, D., Lane, C. and Markey, S.P. 1989. Cerebrospinal fluid quinolinic acid concentrations are increased in acquired immune deficiency syndrome. *Ann Neurol.* 26:275-277.

Higuchi, K., Kuno, S. and Hayaishi, O. 1963. Enzymatic formation of D-kynurenine. *Federation Proc.* 22:243.

Hirata, F., Nomiya, S. and Hayaishi, O. 1975. Indoleamine 2,3-dioxygenase. Note I. Catalytic and molecular properties. *Acta Vitaminol Enzymol.* 29(1-6):288-290.

Holmes, E.W., Russell, P.M., Kinzler, G.J., Reckard, C.R., Flanigan, R.C., Thompson, K.D. and Bermes, E.W. Jr. 1992. Oxidative tryptophan metabolism in renal allograft recipients: increased kynurenine synthesis is associated with inflammation and OKT3 therapy. *Cytokine* 4(3):205-213.

Horisberger, M.A., Staeheli, P. and Haller, O. 1983. Interferon induces a unique protein in mouse cells bearing a gene for resistance to influenza virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(7):1910-1914.

Hsu, E.C., Iorio, C., Sarangi, F., Khine, A.A. and Richardson, C.D. 2001. CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* 279(1):9-21. Erratum in: *Virology* 2001 Mar 1;281(1):151.

Hu, A., Cathomen, T., Cattaneo, R. and Norrby, E. 1995. Influence of N-linked oligosaccharide chains on the processing, cell surface expression and function of the measles virus fusion protein. *J Gen Virol.* 76 (Pt 3):705-710.

Hu, A., Cattaneo, R., Schwartz, S. and Norrby, E. 1994 a. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol.* 75 (Pt 5):1043-1052.

Hu, A., Kovamees, J. and Norrby, E. 1994 b. Intracellular processing and antigenic maturation of measles virus hemagglutinin protein. *Arch Virol.* 136(3-4):239-253.

Hu, A. and Norrby, E. 1994 c. Role of individual cysteine residues in the processing and antigenicity of the measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol.* 75 (Pt 9):2173-2181.

I

Igarashi, K., Garotta, G., Ozmen, L., Ziemiecki, A., Wilks, A.F., Harpur, A.G., Larner, A.C. and Finbloom, D.S. 1994. Interferon-gamma induces tyrosine phosphorylation of interferon-gamma receptor and regulated association of protein tyrosine kinases, Jak1 and Jak2, with its receptor. *J Biol Chem.* 269(20):14333-14336.

Iordanov, M.S., Paranjape, J.M., Zhou, A., Wong, J., Williams, B.R., Meurs, E.F., Silverman, R.H. and Magun, B.E. 2000. Activation of p38 mitogen-activated protein kinase and c-Jun NH(2)-terminal kinase by double-stranded RNA and encephalomyocarditis virus: involvement of RNase L, protein kinase R, and alternative pathways. *Mol Cell Biol.* 20(2):617-627.

Isaacs, A. and Lindenmann, J. 1957. "Virus Interference. I. The Interferon." *Proc.R.Soc.Lond.* 147: 258-267.

Isaacson, S.H., Asher, D.M., Godec, M.S., Gibbs, C.J. and Gajdusek, D.C. 1996. Widespread, restricted low-level measles virus infection of brain in a case of subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neuropathol.* 91:135-139.

J

Jabbour, J.T., Duenas, D.A., Sever, J.L., Krebs, H.M. and Horta-Barbosa, L. 1972. Epidemiology of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). A report of the SSPE registry. *JAMA* 220(7):959-962.

Jacobs, B.L. and Langland, J.O. 1996. When two strands are better than one: the mediators and modulators of the cellular responses to double-stranded RNA. *Virology* 219(2):339-349.

Jiang, H. and Pillai, S. 1998. Complement regulatory proteins on the sperm surface: relevance to sperm motility. *Am J Reprod Immunol.* 39(4):24324-2438.

Johnston, I.C.D., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. and Schneider-Schaulies, S. 1999. A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism. *J Virol.* 73:6903-6915.

Johnstone, R.W., Loveland, B.E. and McKenzie, I.F. 1993 a. Identification and quantification of complement regulator CD46 on normal human tissues. *Immunology* 79(3):341-347.

Johnstone, R.W., Russell, S.M., Loveland, B.E. and McKenzie, I.F. 1993 b. Polymorphic expression of CD46 protein isoforms due to tissue-specific RNA splicing. *Mol Immunol.* 30(14):1231-1241.

Julkunen, I., Sareneva, T., Pirhonen, J., Ronni, T., Melen, K. and Matikainen, S. 2001. Molecular pathogenesis of influenza A virus infection and virus-induced regulation of cytokine gene expression. *Cytokine Growth Factor Rev.* 12(2-3):171-180.

K

Kallstrom, H., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., and Jonsson, A. B. 1997. Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol. Microbiol.* 25:639-647.

Karp, C.L., Wysocka, M., Wahl, L.M., Ahearn, J.M., Cuomo, P.J., Sherry, B., Trinchieri, G. and Griffin, D.E. 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science.* 273(5272):228-231. Erratum in: *Science* 1997 Feb 21;275(5303):1053.

Kato, A., Kiyotani, K., Sakai, Y., Yoshida, T., and Nagai, Y. 1997. The paramyxovirus, Sendai virus, V protein encodes a luxury function required for viral pathogenesis. *EMBO J.* 16:578-587.

Katz, M. 1995. Clinical spectrum of measles. *Curr Top Microbiol Immunol.* 191:1-12.

Kempe, C. H., and Fulginiti, V. A. 1965. The pathogenesis of measles virus infection. *Arch. Ges. Virusforsch.* 16:103-128.

Kerr, I.M. and Brown, R.E. 1978. pppA2'p5'A2'p5'A: an inhibitor of protein synthesis synthesized with an enzyme fraction from interferon-treated cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75(1):256-260.

Khabar, K.S., Dhalla, M., Siddiqui, Y., Zhou, A., Al-Ahdal, M.N., Der, S.D., Silverman, R.H. and Williams, B.R. 2000. Effect of deficiency of the double-stranded RNA-dependent protein kinase, PKR, on antiviral resistance in the presence or absence of ribonuclease L: HSV-1 replication is particularly sensitive to deficiency of the major IFN-mediated enzymes. *J Interferon Cytokine Res.* 20(7):653-659.

Kitamura, M., Matsumiya, K., Yamanaka, M., Takahara, S., Hara, T., Matsumoto, M., Namiki, M., Okuyama, A. and Seya, T. 1997. Possible association of infertility with sperm-specific abnormality of CD46. *J Reprod Immunol.* 33(1):83-88.

Kirk, J., Zhou, A.L., McQuaid, S., Cosby, S.L. and Allen, I.V. 1991. Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis: ultrastructural and in situ hybridization evidence. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 17:289-297.

Kleinschmidt-DeMasters, B.K. and Gilden, D.H. 2001. The expanding spectrum of herpesvirus infections of the nervous system. *Brain Pathol.* 11(4):440-451.

Knight, E. Jr. 1976 a. Interferon: purification and initial characterization from human diploid cells. *Proc Natl Acad Sci U S A.* Feb;73(2):520-523.

Knight, E. Jr. 1976 b. Antiviral and cell growth inhibitory activities reside in the same glycoprotein of human fibroblast interferon. *Nature.* Jul 22;262(5566):302-303.

Komatsu, T., Bi, Z. and Reiss, C.S. 1996. Interferon-gamma induced type I nitric oxide synthase activity inhibits viral replication in neurons. *J Neuroimmunol.* 68(1-2):101-108.

Kotenko, S.V., Izotova, L.S., Pollack, B.P., Mariano, T.M., Donnelly, R.J., Muthukumaran, G., Cook, J.R., Garotta, G., Silvennoinen, O., Ihle, J.N., et al. 1995. Interaction between the components of the interferon gamma receptor complex. *J Biol Chem.* 270(36):20915-20921.

Koumoumou, D.W. and Wild, T.F. 2002. Adaptation of wild-type measles virus to tissue culture. *J Virol.* 76:1505-1509.

Krantic, S., Gimenez, C. and Rabourdin-Combe, C. 1995. Cell-to-cell contact via measles virus haemagglutinin-CD46 interaction triggers CD46 downregulation. *J Gen Virol.* 76 (Pt 11):2793-2800.

Krug, R.M., Shaw, M., Broni, B., Shapiro, G. and Haller, O. 1985. Inhibition of influenza viral mRNA synthesis in cells expressing the interferon-induced Mx gene product. *J Virol.* 56(1):201-206.

Kruse, M., Meinel, E., Henning, G., Kuhnt, C., Berchtold, S., Berger, T., Schuler, G. and Steinkasserer, A. 2001. Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta. *J Immunol.* 167(4):1989-1995.

Kündig, T.M., Hengartner, H. and Zinkernagel, R.M. 1993. T cell-dependent IFN-gamma exerts an antiviral effect in the central nervous system but not in peripheral solid organs. *J Immunol.* 150:2316-2321.

Kurup, R.K. and Kurup, P.A. 2002. Hypothalamic digoxin-mediated model for subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurovirol.* 8(4):326-334.

Kurita-Taniguchi, M., Hazeki, K., Murabayashi, N., Fukui, A., Tsuji, S., Matsumoto, M., Toyoshima, K. and Seya, T. 2002. Molecular assembly of CD46 with CD9, alpha3-beta1 integrin and protein tyrosine phosphatase SHP-1 in human macrophages through differentiation by GM-CSF. *Mol Immunol.* 38(9):689-700.

L

Langdon, S.P. 2004. Cell culture contamination: an overview. *Methods Mol Med.* 88:309-317.

Langmuir, A.D. 1962. Medical importance of measles. *Am J Dis Child.* 103:224-226.

Langmuir, A.D., Henderson, D.A., Serfling, R.E. and Sherman, I.L. 1962. The importance of measles as a health problem. *Am J Public Health.* 52(2)Suppl:1-4.

Lamb, R.A., and Kolakofsky, D. 2001. Paramyxovirus: the viruses and their replication, p. 1305-1340. *In* D. M. Knipe and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 4th ed., vol. 1. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, Pa.

- Laude, H. 1978.** A direct plaque assay for hog cholera virus. *J Gen Virol.* 40(1):225-8.
- Lawrence, D.M.P., Patterson, C.E., Gales, T.L., D'Orazio, J.L., Vaughn, M.M. and Rall, G.F. 2000.** Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production. *J Virol.* 74:1908-1918.
- Leaman, D.W. 1998.** Mechanisms of interferon action. *Prog Mol Subcell Biol.* 20:101-142.
- Lecouturier, V., Fayolle J., Caballero M., Carabana J., Celma M. L., Fernandez-Munoz, R., Wild, T. F. and Buckland, R. 1996.** Identification of Two Amino Acids in the Hemagglutinin Glycoprotein of Measles Virus (MV) That Govern Hemadsorption, HeLa Cell Fusion, and CD46 Downregulation: Phenotypic Markers That Differentiate Vaccine and Wild-Type MV Strains. *J. Virol.* 70:4200-4204.
- Lee, S.B., Bablanian, R. and Esteban, M. 1996.** Regulated expression of the interferon-induced protein kinase p68 (PKR) by vaccinia virus recombinants inhibits the replication of vesicular stomatitis virus but not that of poliovirus. *J Interferon Cytokine Res.* 16(12):1073-1078.
- Lengyel, P. 1993.** Tumor-suppressor genes: news about the interferon connection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 90(13):5893-5895.
- Li, X., Leung, S., Kerr, I.M. and Stark, G.R. 1997.** Functional subdomains of STAT2 required for preassociation with the alpha interferon receptor and for signaling. *Mol Cell Biol.* 17(4):2048-2056.
- Lightwood, R. and Nolan, R. 1970.** Epithelial giant cells in measles as an acid in diagnosis. *J Pediatr.* 77(1):59-64.
- Liszewski, M.K. and Atkinson, J.P. 1996.** Membrane cofactor protein (MCP; CD46). Isoforms differ in protection against the classical pathway of complement. *J Immunol.* 156(11):4415-4421.
- Liszewski, M.K., Farries, T.C., Lublin, D.M., Rooney, I.A. and Atkinson, J.P. 1996.** Control of the complement system. *Adv. Immunol.* 61:201-283.
- Liszewski, M.K., Leung, M., Cui, W., Subramanian, V.B., Parkinson, J., Barlow, P.N., Manchester, M. and Atkinson, J.P. 2000.** Dissecting sites important for complement regulatory activity in membrane cofactor protein (MCP; CD46). *J Biol Chem.* 275(48):37692-37701.
- Liszewski, M. K., Post, T. W., and Atkinson, J. P. 1991.** Membrane Cofactor Protein (MCP or CD46): Newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Ann. Rev.Immunol.* 9:431-455.
- Liszewski, M.K., Tedja, I., and Atkinson, J.P. 1994.** Membrane cofactor protein (CD46) of complement. Processing differences related to alternatively spliced cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 269:10776-10779.

Loveland, B. E., Johnstone, R. W., Russel, S. M., Thorley, B. R., and McKenzie, I. F. C. 1993. Different membrane cofactor protein (CD46) isoforms protect transfected cells against antibody and complement mediated lysis. *Transplant. Immunol.* 1:101-108.

Lowenstein, C.J., Hill, S.L., Lafond-Walker, A., Wu, J., Allen, G., Landavere, M., Rose, N.R. and Herskowitz, A. 1996. Nitric oxide inhibits viral replication in murine myocarditis. *J Clin Invest.* 97(8):1837-1843.

Lozahic, S., Christiansen, D., Manie, S., Gerlier D, Billard M, Boucheix C, Rubinstein E. 2000. CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple beta1 integrins and tetraspans. *Eur J Immunol.* 2000 Mar;30(3):900-907.

Ludford-Menting, M.J., Thomas, S.J., Crimeen, B., Harris, L.J., Loveland, B.E., Bills, M., Ellis, S. and Russell, S.M. 2002. A functional interaction between CD46 and DLG4: a role for DLG4 in epithelial polarization. *J Biol Chem.* 277(6):4477-4484.

Ludwig, M.S., Hautmann, W., and Wildner, M. 2004. [Surveillance of notifiable infectious diseases in Bavaria – results in 2002]. *Gesundheitswesen.* 66 Suppl 1:S13-20.

Lutfalla, G., Gardiner, K., Proudhon, D., Vielh, E. and Uze, G. 1992. The structure of the human interferon alpha/beta receptor gene. *J Biol Chem.* 267(4):2802-2809.

M

Maisner, A., Alvarez, J., Liszewski, M.K., Atkinson, D.J., Atkinson, J.P. and Herrler, G. 1996. The N-glycan of the SCR 2 region is essential for membrane cofactor protein (CD46) to function as a measles virus receptor. *J Virol.* 70(8):4973-4977.

Maitra, R.K. and Silverman, R.H. 1998. Regulation of human immunodeficiency virus replication by 2',5'-oligoadenylate-dependent RNase L. *J Virol.* 72(2):1146-1152.

Malmgaard, L. 2004. Induction and regulation of IFNs during viral infections. *J Interferon Cytokine Res.* 24(8):439-454.

Maloney, E.M., St. Clair, M.O., Widner, B., Werner, E.R. and Fuchs, D. 2000. Central nervous system activation of the indoleamine 2,3-dioxygenase pathway in human T cell lymphotropic virus type I-associated myelopathy/tropical spastic paraparesis. *J Infect Dis.* 181:2037-2040.

Malvoisin, E. and Wild, T.F. 1993. Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins. *J Gen Virol.* 74 (Pt 11):2365-2372.

Manchester, M. Liszewski, M.K., Atkinson, J.P., Oldstone, M.B. 1994. Multiple isoforms of CD46 (membrane cofactor protein) serve as receptors for measles virus. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 15;91(6):2161-2165.

Manchester, M., Nanche, D. and Stehle, T. 2000. CD46 as a measles receptor: form follows function. *Virology* 274(1):5-10.

- Manie, S.N., Debreyne, S., Vincent, S. and Gerlier, D. 2000.** Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *Virology*. 74(1):305-311.
- Mannick, J.B., Asano, K., Izumi, K., Kieff, E. and Stamler, J.S. 1994.** Nitric oxide produced by human B lymphocytes inhibits apoptosis and Epstein-Barr virus reactivation. *Cell* 79(7):1137-1146.
- Marin V, Kaplanski G, Gres S, Farnarier C, Bongrand P. 2001.** Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods*. 254(1-2):183-190.
- Marsters, S.A., Pennica, D., Bach, E., Schreiber, R.D. and Ashkenazi, A. 1995.** Interferon gamma signals via a high-affinity multisubunit receptor complex that contains two types of polypeptide chain. *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(12):5401-5405.
- Masse, N., Barrett, T., Muller, C.P., Wild, T.F. and Buckland, R. 2002.** Identification of a second major site for CD46 binding in the hemagglutinin protein from a laboratory strain of measles virus (MV): potential consequences for wild-type MV infection. *J Virol*. 76(24):13034-13038.
- Maurer, K., Krey, T., Moennig, V., Thiel, H.J. and Rumenapf, T. 2004.** CD46 is a cellular receptor for bovine viral diarrhoea virus. *J Virol*. 78(4):1792-1799.
- Mavaddat, N., Mason, D.W., Atkinson, P.D., Evans, E.J., Gilbert, R.J., Stuart, D.I., Fennelly, J.A., Barclay, A.N., Davis, S.J. and Brown, M.H. 2000.** Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *J Biol Chem*. 275(36):28100-28109.
- de la Maza, L.M. and Peterson, E.M. 1988.** Dependence of the in vitro antiproliferative activity of recombinant human γ -interferon on the concentration of tryptophan in the culture media. *Cancer Res*. 48:346-350.
- MacKenzie, C.R., Hadding, U. and Däubener, W. 1998 a.** Interferon-gamma-induced activation of indoleamine 2,3-dioxygenase in cord blood monocyte-derived macrophages inhibits the growth of group B streptococci. *J Infect Dis*. 178(3):875-878.
- MacKenzie, C.R., Willberg, C.B. and Däubener, W. 1998 b.** Inhibition of group B streptococcal growth by IFN gamma-activated human glioblastoma cells. *J Neuroimmunol*. 89(1-2):191-197.
- McQuaid, S., Campbell, S., Wallace, I.J., Kirk, J. and Cosby, S.L. 1998.** Measles virus infection and replication in undifferentiated and differentiated human neuronal cells in culture. *J Virol*. 72:5245-5250.
- McQuaid, S. and Cosby, S.L. 2002.** An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAMF2, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis. *Lab Invest*. 82:1-7.

Mellor, A.L. and Munn, D.H. 1999. Tryptophan catabolism and T-cell tolerance: immunosuppression by starvation? *Immunol Today*. 20(10):469-473.

Menezes, J., Leibold, W., Klein, G., and Clements, G. 1975. Establishment and characterisation of an Epstein-Barr (EBV)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV-genome-negative african burkitt's lymphoma. *Biomedicine* 22:276-284.

Meroni, L., Fusi, M.L., Varchetta, S., Biasin, M., Rusconi, S., Villa, M.L., De Vries, J.E., Aversa, G., Galli, M. and Clerici, M. 1999. Altered signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) expression in HIV infection and redirection of HIV-specific responses via SLAM triggering. *Clin Immunol*. 92(3):276-284.

Mester, J.C. and Rouse, B.T. 1991. The mouse model and understanding immunity to herpes simplex virus. *Rev Infect Dis*. Nov-Dec;13 Suppl 11:S935-945.

ter Meulen, V. and Billeter, M.A. 1995. Measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol*. 191:13-33.

Miller, G. and Lipman, M. 1973. Release of infectious Epstein-Barr virus by transformed marmoset leukocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 70(1):190-194.

Minagawa, H., Tanaka, K., Ono, N., Tatsuo, H. and Yanagi, Y. 2001. Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol*. 82(Pt 12):2913-2917.

Modlin, J.F., Halsey, N.A. and Herrmann, K.L. 1977 a. Infantile onset of SSPE. *J Pediatr*. 91(1):168-169.

Modlin, J.F., Jabbour, J.T., Witte, J.J. and Halsey, N.A. 1977 b. Epidemiologic studies of measles, measles vaccine, and subacute sclerosing panencephalitis. *Pediatrics* 59(4):505-512.

Modrow, S. and Falke, F. 1997. *Molekulare Virologie*, Spektrum Verlag.

Moeller, K., Duffy, I., Duprex, P., Rima, B., Beschorner, R., Fauser, S., Meyermann, R., Niewiesk, S., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. 2001. Recombinant measles virus expressing altered hemagglutinin (H) genes: functional separation of mutations determining H antibody escape from neurovirulence. *J Virol*. 75:7612-7620.

Moench, T. R., Griffin, D. E., Obriecht, C. R., Vaisberg, A. J., and Johnson, R. T. 1988. Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA. *J. Infect. Dis*. 158:433-442.

Moffett, J.R. and Nambodiri, M.A. 2003. Tryptophan and the immune response. *Immunol Cell Biol*. 81(4):247-265.

Mogensen, K.E., Lewerenz, M., Reboul, J., Lutfalla, G. and Uze, G. 1999. The type I interferon receptor: structure, function, and evolution of a family business. *J Interferon Cytokine Res*. 19(10):1069-1098.

Moll, M., Klenk, H.-D., Herrler, G. and Maisner, A. 2001. A single amino acid change in the cytoplasmic domains of measles virus glycoproteins H and F alters targeting, endocytosis, and cell fusion in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem.* 276:17887-17894.

Moss, M.L., Jin, S.L., Becherer, J.D., Bickett, D.M., Burkhart, W., Chen, W.J., Hassler, D., Leesnitzer, M.T., McGeehan, G., Milla, M., Moyer, M., Rocque, W., Seaton, T., Schoenen, F., Warner, J. and Willard, D. 1997. Structural features and biochemical properties of TNF-alpha converting enzyme (TACE). *J Neuroimmunol.* 72(2):127-129.

Muller, U., Steinhoff, U., Reis, L.F., Hemmi, S., Pavlovic, J., Zinkernagel, R.M. and Aguet, M. 1994. Functional role of type I and type II interferons in antiviral defense. *Science* 264(5167):1918-1921.

Mulky, A., Sarafianos, S.G., Jia, Y., Arnold, E. and Kappes, J.C. 2005. Identification of amino acid residues in the human immunodeficiency virus type-1 reverse transcriptase tryptophan-repeat motif that are required for subunit interaction using infectious virions. *J Mol Biol.* 349(4):673-684.

Munn, D.H., Zhou, M., Attwood, J.T., Bondarev, I., Conway, S.J., Marshall, B., Brown, C. and Mellor, A.L. 1998. Prevention of allogeneic fetal rejection by tryptophan catabolism. *Science* 281(5380):1191-1193.

N

Nagano, I., Nakamura, S., Yoshioka, M., Onodera, J., Kogure, K. and Itoyama, Y. 1994. Expression of cytokines in brain lesions in subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology.* 44:710-715.

Nagy, N., Cerboni, C., Mattsson, K., Maeda, A., Gogolak, P., Sumegi, J., Lanyi, A., Szekely, L., Carbone, E., Klein, G. and Klein, E. 2000. SH2D1A and SLAM protein expression in human lymphocytes and derived cell lines. *Int J Cancer.* 88(3):439-447.

Naim, H.Y., Ehler, E. and Billeter, M.A. 2000. Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *EMBO J.* 19(14):3576-3585.

Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T.F., Rossi, B., Rabourdin-Combe, C. and Gerlier, D. 1993 a. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* 67: 6025-6032.

Naniche, D., Wild, T.F., Rabourdin-Combe, C. and Gerlier, D. 1993 b. Measles virus haemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J Gen Virol.* 74 (Pt 6):1073-1079.

Naniche, D., Yeh, A., Eto, D., Manchester, M., Friedman, R.M. and Oldstone, M.B.A. 2000. Evasion of host defenses by measles virus: wild-type measles virus infection interferes with induction of alpha/beta interferon production. *J Virol.* 74:7478-7484.

Nichols, K.E. 2000. X-linked lymphoproliferative disease: genetics and biochemistry. *Rev Immunogenet.* 2(2):256-266.

Nickells, M.W. and Atkinson, J.P. 1990. Characterization of CR1- and membrane cofactor protein-like proteins of two primates. *J Immunol.* 144(11):4262-4268.

Nielsen, L., Blixenkroner-Møller, M., Thylstrup, M., Hansen, N.J.V. and Bolt, G. 2001. Adaptation of wild-type measles virus to CD46 receptor usage. *Arch Virol.* 146:197-208.

Nomura, M., Kitamura, M., Matsumiya, K., Tsujimura, A., Okuyama, A., Matsumoto, M., Toyoshima, K. and Seya, T. 2001. Genomic analysis of idiopathic infertile patients with sperm-specific depletion of CD46. *Exp Clin Immunogenet.* 18(1):42-50.

Noris, M., Brioschi, S., Caprioli, J., Todeschini, M., Bresin, E., Porrati, F., Gamba, S. and Remuzzi, G.; International Registry of Recurrent and Familial HUS/TTP. 2003. Familial haemolytic uraemic syndrome and an MCP mutation. *Lancet* 362(9395):1542-1547.

Norrby, E. and Kristensson, K. 1997. Measles virus in the brain. *Brain Res Bull.* 44(3):213-220.

Novick, D., Cohen, B. and Rubinstein, M. 1994. The human interferon alpha/beta receptor: characterization and molecular cloning. *Cell* 77(3):391-400.

O

Obojes, K., Andres, O., Kim, K.S., Däubener, W. and Schneider-Schaulies, J. 2005. Indoleamine 2,3-dioxygenase mediates cell type-specific anti-measles virus activity of gamma interferon. *J Virol.* 79(12):7768-7776.

Ogata, A., Czub, S., Ogata, S., Cosby, S.L., McQuaid, S., Budka, H., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. 1997. Absence of measles virus receptor (CD46) in lesions of subacute sclerosing panencephalitis brains. *Acta Neuropathol (Berl)* 94 (5):444-449.

Oglesby, T.J., Allen, C.J., Liszewski, M.K., White, D.J. and Atkinson, J.P. 1992. Membrane cofactor protein (CD46) protects cells from complement-mediated attack by an intrinsic mechanism. *J Exp Med.* 175(6):1547-1551.

Ohgimoto, S., Ohgimoto, K., Niewiesk, S., Klagge, I.M., Pfeuffer, J., Johnston, I.C., Schneider-Schaulies, J., Weidmann, A., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. 2001. The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro. *J Gen Virol.* 82(Pt 8):1835-1844.

Okada, N., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., and Caperon, M. 1995. Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *PNAS* 92:2489-2493.

Okada, H., Sato, T.A., Katayama, A., Higuchi, K., Shichijo, K., Tsuchiya, T., Takayama, N., Takeuchi, Y., Abe, T., Okabe, N. and Tashiro, M. 2001. Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol.* 146(5):859-874.

Ono, N., Tatsuo, H., Tanaka, K., Minagawa, H. and Yanagi, Y. 2001. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J Virol.* 75(4):1594-1600.

Ohno, S., Seki, F., Ono, N. and Yanagi, Y. 2003. Histidine at position 61 and its adjacent amino acid residues are critical for the ability of SLAM (CD150) to act as a cellular receptor for measles virus. *J Gen Virol.* 84(Pt 9):2381-2388.

Ozaki, Y., Edelstein, M.P. and Duch, D.S. 1988. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase: a mechanism of the antitumor activity of interferon gamma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 85(4):1242-1246.

Ovsyannikova, I.G., Reid, K.C., Jacobson, R.M., Oberg, A.L., Klee, G.G. and Poland, G.A. 2003. Cytokine production patterns and antibody response to measles vaccine. *Vaccine* 21(25-26):3946-3953.

P

Pace, J.L., Russell, S.W., LeBlanc, P.A. and Murasko, D.M. 1985 a. Comparative effects of various classes of mouse interferons on macrophage activation for tumor cell killing. *J Immunol.* 134(2):977-981.

Pace, J.L., Varesio, L., Russell, S.W. and Blasi, E. 1985 b. The strain of mouse and assay conditions influence whether MuIFN-gamma primes or activates macrophages for tumor cell killing. *J Leukoc Biol.* 1985 Apr;37(4):475-479.

Palosaari, H., Parisien, J., Rodriguez, J., Ulane, C. and Horvath, C. 2003. STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol.* 77:7635-7644.

Parks, C.L., Lerch, R.A., Walpita, P., Wang, H.P., Sidhu, M.S. and Udem, S.A. 2001 a. Comparison of predicted amino acid sequences of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol.* 75(2):910-920.

Parks, C.L., Lerch, R.A., Walpita, P., Wang, H.P., Sidhu, M.S. and Udem, S.A. 2001 b. Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. *J Virol.* 75(2):921-933.

Parra, B., Hinton, D.R., Marten, N.W., Bergmann, C.C., Lin, M.T., Yang, C.S. and Stohlman, S.A. 1999. IFN-gamma is required for viral clearance from central nervous system oligodendroglia. *J Immunol.* 162:1641-1647.

Paterson, R.G., Leser, G.P., Shaughnessy, M.A., and Lamb, R.A. 1995. The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology* 208:121-131.

Patterson, C.E., Lawrence, D.M., Echols, L.A. and Rall, G.F. 2002. Immune-mediated protection from measles virus-induced central nervous system disease is noncytolytic and gamma interferon dependent. *J Virol.* 76(9):4497-4506.

Patterson, J.B., Thomas, D., Lewicki, H., Billeter, M.A. and Oldstone, M.B. 2000. V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology*. 267:80-89.

Pavlovic, J., Arzet, H.A., Hefti, H.P., Frese, M., Rost, D., Ernst, B., Kolb, E., Staeheli, P. and Haller, O. 1995. Enhanced virus resistance of transgenic mice expressing the human MxA protein. *J Virol*. 69(7):4506-4510.

Pavlovic, J., Haller, O. and Staeheli, P. 1992. Human and mouse Mx proteins inhibit different steps of the influenza virus multiplication cycle. *J Virol*. 66(4):2564-2569.

Perkins, M.N. and Stone, T.W. 1983. Pharmacology and regional variations of quinolinic acid-evoked excitations in the rat central nervous system. *J Pharmacol Exp Ther*. 226:551-557.

Persichini, T., Colasanti, M., Lauro, G.M. and Ascenzi, P. 1998. Cysteine nitrosylation inactivates the HIV-1 protease. *Biochem Biophys Res Commun*. 250(3):575-576.

Pfefferkorn, E.R. 1984. Interferon-gamma blocks the growth of *Toxoplasma gondii* in human fibroblasts by inducing the host cells to degrade tryptophan. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 81(3):908-912.

Pfefferkorn, E.R., Rebhun, S. and Eckel, M. 1986. Characterization of an indoleamine 2,3-dioxygenase induced by gamma interferon in cultured human fibroblasts. *J Interferon Res*. 6:267-279.

Plempner, R., Hammond, A.L., Gerlier, D., Fielding, A.K. and Cattaneo, R. 2002. Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus. *J Virol*. 76:5051-5061.

Polacino, P.S., Pinchuk, L.M., Sidorenko, S.P. and Clark, E.A. 1996. Immunodeficiency virus cDNA synthesis in resting T lymphocytes is regulated by T cell activation signals and dendritic cells. *J Med Primatol*. 25(3):201-209.

Praefcke, G.J. and McMahon, H.T. 2004. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol*. 5(2):133-147.

Puck, T.T., Cieciura, S.J. and Robinson, A. 1958. Genetics of somatic mammalian cells. III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects. *J Exp Med*. 108(6):945-956.

Punnonen, J., Cocks, B.G., Carballido, J.M., Bennett, B., Peterson, D., Aversa, G. and de Vries, J.E. 1997. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* 185(6): 993-1004.

R

Radecke, F. and Billeter, M.A. 1996. The nonstructural C protein is not essential for multiplication of Edmonston B strain measles virus in cultured cells. *Virology*. 217(1):418-421.

- Rakoczy, P.E., Lai, M.C., Baines, M.G., Spilsbury, K. and Constable, I.J. 1998.** Expression of cathepsin S antisense transcripts by adenovirus in retinal pigment epithelial cells. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 39(11):2095-2104.
- Rapp, F. 1964.** Plaque differentiation and replication of virulent and attenuated strains of measles virus. *J. Bacteriol.* 88:1448-1458.
- Richards, A., Kemp, E.J., Liszewski, M.K., Goodship, J.A., Lampe, A.K., Decorte, R., Muslumanoglu, M.H., Kavukcu, S., Filler, G., Pirson, Y., Wen, L.S., Atkinson, J.P. and Goodship, T.H. 2003.** Mutations in human complement regulator, membrane cofactor protein (CD46), predispose to development of familial hemolytic uremic syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100(22):12966-12971.
- Richardson, C., Hull, D., Greer, P., Hasel, K., Berkovich, A., Englund, G., Bellini, W., Rima, B. and Lazzarini, R. 1986.** The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses. *Virology* 155(2):508-523.
- Richardson, C.D., Berkovich, A., Rozenblatt, S. and Bellini, W.J. 1985.** Use of antibodies directed against synthetic peptides for identifying cDNA clones, establishing reading frames, and deducing the gene order of measles virus. *J Virol.* 54(1):186-193.
- Richert, J.R., McFarland, H.F., McFarlin, D.E., Bellini, W.J. and Lake, P. 1983.** Cloned measles virus-specific T lymphocytes from a twin with multiple sclerosis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 80(2):555-559.
- Riley, R.C., Kemper, C., Leung, M. and Atkinson, J.P. 2002.** Characterization of human membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa. *Mol Reprod Dev.* 62(4):534-546.
- Riley-Vargas, R. C. and Atkinson, J.P. 2003.** Expression of membrane cofactor protein (MCP; CD46) on spermatozoa: just a complement inhibitor? *MAI:* 3, 75-78.
- Riley-Vargas, R.C., Gill, D.B., Kemper, C., Liszewski, M.K. and Atkinson, J.P. 2004.** CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol.* 25(9):496-503.
- Rima, B.K. and Duprex, P.W. 2005.** Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res.* 111 (2):132-147.
- Rima, B.K., Earle, J.A., Baczko, K., ter Meulen, V., Liebert, U.G., Carstens, C., Carabana, J., Caballero, M., Celma, M.L., Fernandez-Munoz, R. 1997.** Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J Gen Virol.* 78 (Pt 1):97-106.
- Robinson, C.M., Hale, P.T. and Carlin, J.M. 2003 a.** The role of IFN-gamma and TNF-alpha-responsive regulatory elements in the synergistic induction of indoleamine dioxygenase. *J Interferon Cytokine Res.* 25(1):20-30.
- Robinson, C.M., Shirey, K.A. and Carlin, J.M. 2003 b.** Synergistic transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by IFN-gamma and tumor necrosis factor-alpha. *J Interferon Cytokine Res.* 23(8):413-421.

Roos, R.P., Graves, M.C., Wollmann, R.L., Chilcote, R.R. and Nixon, J. 1981. Immunologic and virologic studies of measles inclusion body encephalitis in an immunosuppressed host: the relationship to subacute sclerosing panencephalitis. *Neurology* 31(10):1263-1270.

Rosendahl, M.S., Ko, S.C., Long, D.L., Brewer, M.T., Rosenzweig, B., Hedl, E., Anderson, L., Pyle, S.M., Moreland, J., Meyers, M.A., Kohno, T., Lyons, D. and Lichenstein, H.S. 1997. Identification and characterization of a pro-tumor necrosis factor-alpha-processing enzyme from the ADAM family of zinc metalloproteases. *J Biol Chem.* 272(39):24588-24593.

Rota, J.S., Hummel, K.B., Rota, P.A. and Bellini, W.J. 1992. Genetic variability of the glycoprotein genes of current wild-type measles isolates. *Virology.* 188(1):135-142.

Rota, P.A., Bloom, A.E., Vanchiere, J.A. and Bellini, W.J. 1994. Evolution of the nucleoprotein and matrix genes of wild-type strains of measles virus isolated from recent epidemics. *Virology.* 198(2):724-730.

Rota, P.A., Rota, J.S., Redd, S.B., Papania, M.J. and Bellini, W.J. 2004. Genetic analysis of measles viruses isolated in the united states between 1989 and 2001: absence of an endemic genotype since 1994. *J Infect Dis.* 189 Suppl 1:S160-164.

Rubin, B.Y., Anderson, S.L., Hellermann, G.R., Richardson, N.K. Lunn, R.M. and Valinsky, J.E. 1988. The development of antibody to the interferon induced indoleamine 2,3-dioxygenase and the study of the regulation of its synthesis. *J Interferon Res* 8:691-702.

Russell, R., Paterson, R.G. and Lamb, R.A. 1994. Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology* 15;199(1):160-168.

S

Sainz, R. and Halford, W.P. 2002. Alpha/beta interferon and gamma interferon synergize to inhibit the replication of herpes simplex virus type 1. *J Virol.* 76:11541-11550.

Saito, K., Nowak, T.S. Jr., Markey, S.P. and Heyes, M.P. 1993 a. Mechanism of delayed increases in kynurenine pathway metabolism in damaged brain regions following transient cerebral ischemia. *J Neurochem.* 60(1):180-192.

Saito, K., Nowak, T.S. Jr., Suyama, K., Quearry, B.J., Saito, M., Crowley, J.S., Markey, S.P. and Heyes, M.P. 1993 b. Kynurenine pathway enzymes in brain: responses to ischemic brain injury versus systemic immune activation. *J Neurochem.* 61(6):2061-2070.

Samuel, C.E. 1987. Progress toward the understanding of the molecular mechanisms of interferon action. *Prog Clin Biol Res.* 246:209-220.

Santoro, F., Kennedy, P.E., Locatelli, G., Malnati, M.S. Berger, E.A. and Lusso, P. 1999. CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell* 99(7): 817-827.

Sayos, J., Wu, C., Morra, M., Wang, N., Zhang, X., Allen, D., van Schaik, S., Notarangelo, L., Geha, R., Roncarolo, M.G., Oettgen, H., De Vries, J.E., Aversa, G. and Terhorst, C. 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature* 395(6701):462-469.

Scherer, W.F., Syverton, J.T. and Gey, G.O. 1953. Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med.* 97(5):695-710.

Schibli, D.J., Montelaro, R.C. and Vogel, H.J. 2001. The membrane-proximal tryptophan-rich region of the HIV glycoprotein, gp41, forms a well-defined helix in dodecylphosphocholine micelles. *Biochemistry.* 40(32):9570-9578.

Schmitz, J.L., Carlin, J.M., Borden, E.C. and Byrne, G.I. 1989. Beta Interferon inhibits *Toxoplasma gondii* growth in human monocyte-derived macrophages. *Infect Immun.* 57:3254-3256.

Schneider, H., Kaelin, K., and Billeter, M.A. 1997. Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in cultured cells. *Virology* 227:314-322.

Schneider, U., Schwenk, H.U. and Bornkamm, G. 1977. Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma. *Int J Cancer* 19(5):621-626.

Schneider-Schaulies, J. 1998. Die Bedeutung von zellulären Rezeptoren für Tropismus und Virulenz von Morbilliviren. *Med Welt* 19:27-35.

Schneider-Schaulies, J., Dunster, L.M., Kobune, F., Rima, B. and ter Meulen, V. 1995 a. Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J Virol.* 69(11):7257-7259.

Schneider-Schaulies, J., Niewiesk, S., Schneider-Schaulies, S. and ter Meulen, V. 1999. Measles virus in the CNS: the role of viral and host factors for the establishment and maintenance of a persistent infection. *J Neurovirol.* 5(6):613-622.

Schneider-Schaulies, J., Martin, M.J., Logan, J.S., Firsching, R., ter Meulen, V. and Diamond, L.E. 2000. CD46 transgene expression in pig peripheral blood mononuclear cells does not alter their susceptibility to measles virus or their capacity to downregulate endogenous and transgenic CD46. *J Gen Virol.* 81(Pt 6):1431-1438.

Schneider-Schaulies, J., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. 2003. Measles infection of the central nervous system. *J Neurovirol.* 9(2):247-252.

Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J.J., Brinckmann, U., Dunster, L.M., Baczko, K., Liebert, U.G., Schneider-Schaulies, S. and ter Meulen, V. 1995 b. Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 92(9):3943-3947.

- Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J.-J., Schlender, J., Dunster, L. M., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. 1996.** Receptor (CD46) Modulation and Complement-Mediated Lysis of Uninfected Cells after Contact with Measles Virus-Infected Cells. *J. Virol.* 70:255-263.
- Schneider-Schaulies, S., Klagge, I.M. and ter Meulen, V. 2003.** Dendritic cells and measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol.* 276:77-101.
- Schneider-Schaulies, S., Liebert, U.G., Baczko, K. and ter Meulen, V. 1990.** Restricted expression of measles virus in primary rat astroglial cells. *Virology* 177(2):802-806.
- Schneider-Schaulies, S., Liebert, U.G., Segev, Y., Rager-Zisman, B., Wolfson, M. and ter Meulen, V. 1992.** Antibody-dependent transcriptional regulation of measles virus in persistently infected neural cells. *J Virol.* 66(9):5534-41.
- Schneider-Schaulies, S. and ter Meulen, V. 1999.** Pathogenic aspects of measles virus infections. *Arch Virol Suppl.* 15:139-158.
- Schnorr, J.J., Dunster, L.M., Nanan, R., Schneider-Schaulies, J., Schneider-Schaulies, S. and ter Meulen, V. 1995.** Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur J Immunol.* 25(4):976-984.
- Schnorr, J.J., Schneider-Schaulies, J., Simon-Jodicke, A., Pavlovic, J., Horisberger, M.A. and ter Meulen, V. 1993.** MxA-dependent inhibition of measles virus glycoprotein synthesis in a stably transfected human monocytic cell line. *J Virol.* 67(8):4760-4768.
- Schroten, H., Spors, B., Hucke, C., Stins, M., Kim, K.S., Adam, R. and Däubener, W. 2001.** Potential role of human brain microvascular endothelial cells in the pathogenesis of brain abscess: inhibition of *Staphylococcus aureus* by activation of indoleamine 2,3-dioxygenase. *Neuropediatrics.* 32(4):206-210.
- Schwarcz, R., Tamminga, C.A., Kurlan, R. and Shoulson, I. 1988.** Cerebrospinal fluid levels of quinolinic acid in Huntington's disease and schizophrenia. *Ann Neurol.* 24(4):580-582.
- Segerman, A., Atkinson, J.P., Marttila, M., Dennerquist, V., Wadell, G. and Arnberg, N.** Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol.* Sep;77(17):9183-9191.
- Sen, G.C. and Lengyel, P. 1992.** The interferon system. A bird's eye view of its biochemistry. *J Biol Chem.* 267(8):5017-5020.
- Senkevich, T.G., Koonin, E.V., Bugert, J.J., Darai, G. and Moss, B. 1997.** The genome of molluscum contagiosum virus: analysis and comparison with other poxviruses. *Virology* 23;233(1):19-42.
- Seya, T., Hara, T., Matsumoto, M. and Akedo, H. 1990 a.** Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement. High expression of MCP on human leukemia cell lines, which is down-regulated during cell differentiation. *J Immunol.* 145(1):238-245.

- Seya, T., Hara, T., Matsumoto, M., Sugita, Y. and Akedo, H. 1990 b.** Complement-mediated tumor cell damage induced by antibodies against membrane cofactor protein (MCP, CD46). *J Exp Med.* 1990 Dec 1;172(6):1673-1680.
- Seya, T., Hirano, A., Matsumoto, M., Nomura, M., and Ueda, S. 1999.** Human membrane cofactor protein (MCP, CD46): multiple isoforms and functions. *Int J Biochem Cell Biol.* 31(11):1255-1260.
- Seya, T., Nomura, M., Murakami, Y., Begum, N.A., Matsumoto, M. and Nagasawa, S. 1998.** CD46 (membrane cofactor protein of complement, measles virus receptor): structural and functional divergence among species (review). *Int J Mol Med.* 1(5):809-816.
- Shaffer, J. A., Bellini, W. J., and Rota, P.A. 2003.** The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* 315:389-397.
- Shemer-Avni, Y., Wallach, D. and Sarov, I. 1988.** Inhibition of *Chlamydia trachomatis* growth by recombinant tumor necrosis factor. *Infect Immun.* 56:2503-2506.
- Shemer-Avni, Y., Wallach, D. and Sarov, I. 1989.** Reversion of the antichlamydial effect of tumor necrosis factor by tryptophan and antibodies to beta interferon. *Infect Immun* 57:3484-3490.
- Shlapatska, L.M., Mikhalap, S.V., Berdova, A.G., Zelensky, O.M., Yun, T.J., Nichols, K.E., Clark, E.A. and Sidorenko, S.P. 2001.** CD150 association with either the SH2-containing inositol phosphatase or the SH2-containing protein tyrosine phosphatase is regulated by the adaptor protein SH2D1A. *J Immunol.* 166(9):5480-5487.
- Shibahara, K., Hotta, H., Katayama, Y. and Homma, M. 1994.** Increased binding activity of measles virus to monkey red blood cells after long-term passage in Vero cell cultures. *J Gen Virol.* 75:3511-3516.
- Shimizu, T., Nomiya, S., Hirata, F. and Hayaishi, O. 1978.** Indoleamine 2,3-dioxygenase. Purification and some properties. *J Biol Chem.* 253:4700-4706.
- Shirasaka, T., Murakami, K., Ford, H., Kelley, J., Yoshioka, H., Kojima, E., Aoki, S., Driscoll, J.S., Broder, S. and Mitsuya, H. 1990.** Halogenated congeners of 2',3'-dideoxypurine nucleosides active against HIV in vitro: a new class of lipophilic prodrugs. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87:9426-9430.
- Shuai, K., Schindler, C., Prezioso, V.R. and Darnell, J.E. Jr. 1992.** Activation of transcription by IFN-gamma: tyrosine phosphorylation of a 91-kD DNA binding protein. *Science* 258(5089):1808-1812.
- Shuai, K., Stark, G.R., Kerr, I.M. and Darnell, J.E. Jr. 1993 a.** A single phosphotyrosine residue of Stat91 required for gene activation by interferon-gamma. *Science* 261(5129):1744-1746.
- Shuai, K., Ziemiecki, A., Wilks, A.F., Harpur, A.G., Sadowski, H.B., Gilman, M.Z. and Darnell, J.E. 1993 b.** Polypeptide signalling to the nucleus through tyrosine phosphorylation of Jak and Stat proteins. *Nature* 366(6455):580-583.

- Sidhu, M.S., Chan, J., Kaelin, K., Spielhofer, P., Radecke, F., Schneider, H., Masurekar, M., Dowling, P.C., Billeter, M.A. and Udem, S.A. 1995.** Rescue of synthetic measles virus minireplicons: measles genomic termini direct efficient expression and propagation of a reporter gene. *Virology* 208(2):800-807.
- Sidorenko, S.P. and Clark, E.A. 1993.** Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol.* 151(9):4614-4624.
- Sidorenko, S.P. and Clark, E.A. 2003.** The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol.* 4(1):19-24.
- Silverman, R.H. 1994.** Fascination with 2-5A-dependent RNase: a unique enzyme that functions in interferon action. *J Interferon Res.* 14(3):101-104.
- Slattery, E., Ghosh, N., Samanta, H. and Lengyel, P. 1979.** Interferon, double-stranded RNA, and RNA degradation: activation of an endonuclease by (2'-5')An. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76(10):4778-4782.
- Snyder, M.J., McCrumb, F.R. Jr., Bigbee, T., Schluederberg, A.E. and Togo, Y. 1962.** Observations on the seroepidemiology of measles. *Am J Dis Child.* 103:250-251.
- Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J. and Klenk, D.C. 1985.** Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem.* 1985 Oct;150(1):76-85. Erratum in: *Anal Biochem* 1987 May 15;163(1):279.
- Smallwood, S., Ryan, K.W., and Moyer, S. A. 1994.** Deletion analysis defines a carboxyl-proximal region of Sendai virus P protein that binds to the polymerase L Protein. *Virology* 2002:154-163.
- Staheli, P. and Pavlovic, J. 1991.** Inhibition of vesicular stomatitis virus mRNA synthesis by human MxA protein. *J Virol.* 65(8):4498-4501.
- Stark, G.R., Kerr, I.M., Williams, B.R., Silverman, R.H. and Schreiber, R.D. 1998.** How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem.* 67:227-264.
- Stewart, W.E., Blalock, J.E., Burke, D.C., Chany, C., Dunnick, J.K., Falcoff, E., Friedman, R.M., Galasso, G.J., Joklik, W.J., Vilcek, J.T., Youngner, J.S. and Zoon, K.G. 1980.** Interferon nomenclature. *J. Immunol.* 125:2353-2355.
- Stins, M.F., Gilles, F. and Kim, K.S. 1997.** Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 76(1-2):81-90.
- Suryanarayana, K., Baczko, K., ter Meulen, V. and Wagner, R.R. 1994.** Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol.* 68(3):1532-1543.

T

Takeuchi, K., Kadota, S., Takeda, M., Miyajima, N. and Nagata, K. 2003. Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett.* 545:177-182.

Takeuchi, K., Takeda, M., Miyajima, N., Kobune, F., Tanabyashi, K. and Tashiro, M. 2002. Recombinant wild-type and Edmonston strain measles virus bearing heterologous H proteins: role of H protein in cell fusion and host cell specificity. *J Virol.* 76:4891-4900.

Takikawa, O., Kuroiwa, T., Yamazaki, F. and Kido, R. 1988. Mechanism of interferon-gamma action. Characterization of indoleamine 2,3-dioxygenase in cultured human cells induced by interferon-gamma and evaluation of the enzyme-mediated tryptophan degradation in its anticellular activity. *J Biol Chem.* 263(4):2041-2048.

Takikawa, O., Yoshida, R., Kido, R. and Hayaishi, O. 1986. Tryptophan degradation in mice initiated by indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Biol Chem.* 261(8):3648-3653.

Tanaka, K., Minagawa, H., Xie, M.F. and Yanagi, Y. 2002. The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Arch Virol.* 147(1):195-203.

Tangye, S.G., Phillips, J.H. and Lanier, L.L. 2000. The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin Immunol.* 12(2):149-157.

Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. and Yanagi, Y. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* 406(6798): 893-897

Tatsuo, H., Ono, N. and Yanagi, Y. 2001. Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J Virol.* 75(13):5842-5850.

Taylor, M.J., Godfrey, E., Baczkowski, K., ter Meulen, V., Wild, T.F. and Rima B.K. 1991. Identification of several different lineages of measles virus. *J Gen Virol.* 72(Pt 1):83-88.

Taylor, M.W. and Feng, G.S. 1991. Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism. *FASEB J.* 5(11):2516-2522.

Taylor-Papadimitriou, J., Purkis, P. and Fentiman I. S. 1980. Cholera toxin and analogues of cyclic AMP stimulate the growth of cultured human mammary epithelial cells. *J Cell Physiol.* 102(3):317-321.

Thomas, S.M., Garrity, L.F., Brandt, C.R., Schobert, C.S., Feng, G.S., Taylor, M.W., Carlin, J.M. and Byrne, G.I. 1993. IFN-gamma-mediated antimicrobial response. Indoleamine 2,3-dioxygenase-deficient mutant host cells no longer inhibit intracellular *Chlamydia* spp. or *Toxoplasma* growth. *J Immunol.* 150(12):5529-5534.

Towbin, H., Staehelin, T. and Gordon, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76(9):4350-4354.

Trinchieri, G., Matsumoto-Kobayashi, M., Clark, S.C., Sehra, J., London, L. and Perussia, B. 1984. Response of resting human peripheral blood natural killer cells to interleukin 2. *J Exp Med.* 160(4):1147-1169.

Tsuchiya, S., Kobayashi, Y., Goto, Y., Okumura, H., Nakae, S., Konno, T. and Tada, K. 1982. Induction of maturation in cultured human monocytic leukemia cells by a phorbol diester. *Cancer Res.* 42(4):1530-1536.

Tsuchiya, S., Yamabe, M., Yamaguchi, Y., Kobayashi, Y., Konno, T. and Tada, K. 1980. Establishment and characterization of a human acute monocytic leukemia cell line (THP-1). *Int J Cancer* 26(2):171-176.

Tumilowicz, J.J., Nichols, W.W., Cholon, J.J. and Greene, A.E. 1970. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma. *Cancer Res.* 1970 Aug;30(8):2110-21118.

U

Urbanska, E.M., Chambers, B.J., Ljunggren, H.G., Norrby, E. and Kristensson, K. 1997. Spread of measles virus through axonal pathways into limbic structures in the brain of Tab +/- mice. *J Med Virol.* 52:362-369.

V

Variar-Krishnan, G., Trescol-Biemont, M.C., Nanche, D., Ravourdin-Combe, C. and Gerlier, D. 1994. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms of CD46 display similar measles virus receptor properties: virus binding, fusion, and replication; down-regulation by hemagglutinin; and virus uptake and endocytosis for antigen presentation by major histocompatibility complex class II molecules. *J Virol.* 68(12):7891-7899.

Veals, S.A., Schindler, C., Leonard, D., Fu, X.Y., Aebersold, R., Darnell, J.E. Jr. and Levy, D.E. 1992. Subunit of an alpha-interferon-responsive transcription factor is related to interferon regulatory factor and Myb families of DNA-binding proteins. *Mol Cell Biol.* 12(8):3315-3324.

Veillette, A. and Latour, S. 2003. The SLAM family of immune-cell receptors. *Curr Opin Immunol.* 15(3):277-285.

Vilcek, J. 2003. Novel interferons. *Nat Immunol.* 4(1):8-9.

Vilcek, J. 1993. Recent progress in the elucidation of interferon alfa/beta and interferon gamma actions. *Semin Hematol.* 30(3 Suppl 3):9-10.

Vitek, C.R., Aduddell, M., Briton, M.J., Hoffmann, R.E. and Redd, S.C. 1999. Increased protections during a measles outbreak of children previously vaccinated with second dose of measles-mumps-rubella vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.* 18(7):620-623.

W

- Wang, G., Liszewski, M.K., Chan, A.C. and Atkinson, J.P. 2000.** Membrane cofactor protein (MCP; CD46): isoform-specific tyrosine phosphorylation. *J Immunol.* 164(4):1839-1846.
- Weck, P.K., Apperson, S., May, L. and Stebbing, N. 1981 a.** Comparison of the antiviral activities of various cloned human interferon-alpha subtypes in mammalian cell cultures. *J Gen Virol.* 57(Pt 1):233-237.
- Weck, P.K., Apperson, S., Stebbing, N., Gray, P.W., Leung, D., Shepard, H.M. and Goeddel, D.V. 1981 b.** Antiviral activities of hybrids of two major human leukocyte interferons. *Nucleic Acids Res.* 9(22):6153-6166.
- Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G. and Wachter, H. 1989.** Characteristics of interferon induced tryptophan metabolism in human cells in vitro. *Biochim Biophys Acta* 1012:142-147.
- Werner-Felmayer, G., Werner, E.R., Fuchs, D., Hausen, A., Reibnegger, G. and Wachter, H. 1990.** Neopterin formation and tryptophan degradation by a human myelomonocytic cell line (THP-1) upon cytokine treatment. *Cancer Res.* 50:2863-2867.
- Wheelock, E.F. 1965.** Interferon-like virus-inhibitor induced in human leukocytes by phytohemagglutinin. *Science* 149:310-311.
- Whitley, R. 1981.** Diagnosis and treatment of herpes simplex encephalitis. *Annu Rev Med.* 32:335-340.
- Whitley, R.J., Corey, L., Arvin, A., Lakeman, F.D., Sumaya, C.V., Wright, P.F., Dunkle, L.M., Steele, R.W., Soong, S.J., Nahmias, A.J. et al. 1988.** Changing presentation of herpes simplex virus infection in neonates. *J Infect Dis.* 158(1):109-116.
- Whitley, R.J. and Roizman, B. 2001.** Herpes simplex virus infections. *Lancet.* 357(9267):1513-1518.
- Widner, B., Laich, A., Sperner-Unterweger, B., Ledochowski, M. and Fuchs, D. 2002.** Neopterin production, tryptophan degradation, and mental depression - what is the link? *Brain Behav Immun.* 16(5):590-595.
- Widner, B., Leblhuber, F., Walli, J., Titz, G.P., Demel, U. and Fuchs, D. 2000.** Tryptophan degradation and immune activation in Alzheimer's disease. *J Neural Transm.* 107:343-353.
- Wild, T.F., Malvoisin, E. and Buckland, R. 1991.** Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol.* 72 (Pt 2):439-442.
- Williams, B.R. and Silverman, R.H. 1998.** Progress in interferon and cytokine biology. *Cytokine Growth Factor Rev.* 9(1):85-87.
- Wilton, A.N., Johnstone, R.W., McKenzie, I.F. and Purcell, D.F. 1992.** Strong associations between RFLP and protein polymorphisms for CD46. *Immunogenetics* 36(2):79-85.

van Wissen, M., Snoek, M., Smids, B., Jansen, H.M. and Lutter, R. 2002. IFN-gamma amplifies IL-6 and IL-8 responses by airway epithelial-like cells via indoleamine 2,3-dioxygenase. *J Immunol.* 169(12):7039-7044.

Wu, S.H. and Shiro, K. 1984. [Comparative studies on multiplication inhibition activity of human IFN on measles and SSPE viruses] *Zhongguo Yi Xue Ke Xue Yuan Xue Bao* 6(2):120-123.

Y

Yamazaki, F., Kuroiwa, T., Takikawa, O. and Kido, R. 1985. Human indolylamine 2,3-dioxygenase. Its tissue distribution, and characterization of the placental enzyme. *Biochem J.* 230(3):635-638.

Yanagi, Y., Ono, N., Tatsuo, H., Hashimoto, K. and Minagawa, H. 2002. Measles virus receptor SLAM (CD150). *Virology* 299(2):155-161.

Yasumura, Y. and Kawakita, Y. 1963. *Nippon Rinsho* 21: 1209.

Yokota, S.-I., Saito, H., Kubota, T., Yokosawa, N., Amano, K.-I. and Fuji, N. 2003. Measles virus suppresses interferon- α signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon- α receptor complex. *Virology.* 306:135-146.

Yoshida, R. and Hayaishi, O. 1978. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by intraperitoneal injection of bacterial lipopolysaccharide. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 75:3998-4000.

Yoshida, R., Urade, Y., Tokuda, M. and Hayaishi, O. 1979. Induction of indoleamine 2,3-dioxygenase in mouse lung during virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 76:4084-4086.

Yoshida, R., Imanishi, J., Oku, T., Kishida, T. and Hayaishi, O. 1981. Induction of pulmonary indoleamine 2,3-dioxygenase by interferon. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 78(1):129-132.

Z

Zaffran, Y., Destaing, O., Roux, A., Ory, S., Nheu, T., Jurdic, P., Rabourdin-Combe, C. and Astier, A.L. 2001. CD46/CD3 costimulation induces morphological changes of human T cells and activation of Vav, Rac, and extracellular signal-regulated kinase mitogen-activated protein kinase. *J Immunol.* 167(12):6780-6785.

Zhang, X., Gelindenin, C., Linke, H., Parks, C.L., Brooks, C., Udem, S.A., and Oglesbee, M. 2002. Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J Virol.* 76(17):8737-8746.

Zoon, K.C., Miller, D., Bekisz, J., zur Nedden, D., Enterline, J.C., Nguyen, N.Y. and Hu, R.Q. 1992. Purification and characterization of multiple components of human lymphoblastoid interferon-alpha. *J Biol Chem.* 1992 Jul 25;267(21):15210-15216.

9 Abkürzungen

A. dest.	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
Amp	Ampicillin
APC	Antigen-präsentierende Zellen
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
BCA	Bicinchoninic Acid
BHS	Blut-Hirn-Schranke
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CCP	“complement control protein repeat“
CDC	“Centers for Disease Control and Prevention“
CHO	“chinese hamster ovar“
CMV	Cytomegalie-Virus
CPE	zytopathischer Effekt
Da	Dalton
DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]octane
DAPI	4'-6-Diamidino-2-phenylindole
ddNTP	didesoxy-Nukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease

dpi	Tage nach der Infektion (“days post infection”)
DTT	Dithio-1,4-threiol
DZ	Dendritische Zellen
ECL	“enhanced chemiluminescence”
EBV	Epstein-Barr Virus
Edm	Edmonston (MV-Vakzine)
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ECGS	“Endothelial cell growth supplement“
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
EZ	Endothelzellen
F-Protein	Fusionsprotein des MV
FACS	Durchflußzytometer (“fluorescence activated cell scanner”)
FG	Fragment
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
FKS	fötales Kälberserum
FP	FACS-Puffer
g	Gramm
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
g/L	Gramm pro Liter
GM-CSF	Granulozyten-Makrophagen Kolonie-stimulierender Faktor
H-Protein	Hämagglutininprotein des MV
h	human
hpi	Stunden nach Infektion (“hours post infection”)
HBSS ⁻	“Hank´s balanced salt solution” ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺
HIV	Humane Immundefizienzvirus
HRP	Meerrettichperoxidase (“horseradish peroxidase“)
HSV-1	Herpes Simplex Virus Type I
HSV-2	Herpes Simplex Virus Type II
HTLV-1	Human T-cell leukemia Virus
ICP0	“immediate early“-Protein der HSV

IDO	Indolamin 2,3-Dioxygenase
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IGS	Intergenische Sequenzen (“intergenic sequences“)
IIF	Indirekte Immunfluoreszenz
IL	Interleukin
ISGF3	“interferon-stimulated gene factor3“
ISGs	“IFN-stimulated genes“
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
L	Liter
LPS	Lipopolysaccharid
m	milli, 10^{-3}
M	Marker
M	Molar, mol/l
M-Protein	Matrixprotein des MV
mAk	monoklonaler Antikörper
MCS	Multiple Klonierungsstelle
MCP	Membran Cofaktor Protein
ME	Merkaptoethanol
MEM	Minimal Essential Medium
mg	Milligramm
μ	mikro, 10^{-6}
μ g	Mikrogramm
μ l	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	millimolar
MG	Molekulargewicht
MIBE	“Measles Inclusion Body Encephalitis“
min	Minute
MOI	infektiöse Dosis (“multiplicity of infection“)

MMP	Magermilchpulver
mRNA	messenger-RNA
MV	Masernvirus
n	nano, 10^{-9}
N-Protein	Nukleo(kapsid)protein des MV
ND	nicht bestimmt (“not determined“)
ng	Nanogramm
NO	Stickstoffoxid
NOS	Stickstoffoxidsynthase
OD	Optische Dichte
ORF	Offene Leserahmen (“open reading frame“)
p	Passage
P-Protein	Phosphoprotein des MV
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PamCSK	Pam 3 CysSerLys 4
PBL	periphere Blutlymphozyten, (“peripheral blood lymphocytes“)
PBMC	periphere mononukleäre Blutzellen
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFU	“plaque forming unit“
PHA	Phytohämagglutinin
POX	Peroxidase
PVDF	Polyvinyliden(di)fluorid
QUIN	Quinolinsäure
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
RPE	“retinal pigment epithelial“
rpm	Umdrehungen pro Minute (“round per minute“)

RPMI	RPMI 1640 Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkription- Polymerase-Kettenreaktion
s	Sekunde
SCR	“short consensus repeat“
SDS	Natriumdodecylsulfat
SIV	Affen-Immundefizienzvirus
SLAM	“signaling lymphocyte activation molecule“
SSPE	Subakute sklerosierende Panenzephalitis
STAT	“signal transducers and activators of transcription“
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TH1	T-Helfer 1-Lymphozyten
TH2	T-Helfer 2-Lymphozyten
TM-	Transmembran-
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-hydroxymethyl-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-hydroxymethyl-Aminomethan-Hydrochlorid
Trp	L-Tryptophan
U	Unit (Enzymeinheit)
ÜN	über Nacht
UNICEF	“The United Nations Children´s Fund“
UV	Ultraviolett
u.v.m.	und vieles mehr
UZ	Ultrazentrifugation
Vol.	Volumen
WB	Western Blot
WHO	Weltgesundheitsorganisation (“World Health Organization“)
WT	Wildtyp
WTF	Wildtyp Fleckenstein-MV
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Lebenslauf

Mag. rer. nat. Karola Obojes

geboren am 14. August 1975

in Bruneck (Italien, Südtirol)

Schulbildung:

1981-1986	Volksschule in St. Vigil-Enneberg, Italien
1986-1989	Mittelschule Herz-Jesu-Institut in Mühlbach/Brixen
1989-1994	Realgymnasium Bruneck

Hochschulbildung:

1994-1997	Studium Biologie/Studienzweig Mikrobiologie Leopold-Franzens-Universität, Innsbruck, Österreich
1997-1999	Studium Biologie/Studienzweig Genetik Paris-Lodron-Universität, Salzburg, Österreich

1999-2001	Diplomarbeit Institut für Molekularbiologie, Österreichische Akademie der Wissenschaften, Salzburg, Österreich Arbeitsgruppe: Uni.-Doz. Dr. Reinhard Vlasak Abteilung Biochemie: Prof. Dr. G. Kreil Thema: "Untersuchung der Rolle der Hämagglutinin- Esterase bei der MHV-Infektion von ZNS-Zellen und beim Sortier-Verhalten in murinen polarisierten Epithelzellen".
-----------	--

11 Veröffentlichungen

11.1 Publikationen und Preise

Ruprecht, K., **Obojes, K.**, Lassmann, H., Wengel, V., Schneider-Schaulies, J., Perron, H. und Rieckmann, P.

MRSV/HERV-W gag Protein: Expression in brain endothelium of acute multiple sclerosis lesions in situ and induction by viral infection in cerebral endothelial cells in vitro.

Eingereicht bei Journal of Neurovirology

Obojes, K., Andres, O., Kim, K.S., Daeubener, W. und Schneider-Schaulies, J.
Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mediates cell type specific anti-measles virus activity of interferon- γ .

Journal of Virology (2005), 79:7768-7776. PMID:15919929

Andres, O., **Obojes, K.**, Kim, K.S., ter Meulen, V. und Schneider-Schaulies, J.
CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses.

Journal of General Virology (2003), 84:1189-1197. PMID: 12692284

Obojes, K., Wurzer, W.J., Mariller, C., Zanetta, J.P., Bauer, H.C. und Vlasak, R.

The Hemagglutinin-Esterase surface glycoprotein of murine coronaviruses influences viral sorting and pathogenicity.

Manuskript in Vorbereitung und Einreichung bei Journal of Virology

Wurzer, W.J.*, **Obojes, K.** * und Vlasak, R.

The sialate-4-O-acetylsterases of coronaviruses related to mouse hepatitis virus: a proposal to reorganize group 2 Coronaviridae.

Journal of General Virology (2002), 83:395-402. PMID: 11807232

* equally contributed

Sackler Preis 2001 (1. Preis: Gruppe B, Diplomarbeit) der Universität Salzburg (08. April, 2002)
(www.sbg.ac.at/aktuelles/presseinformationen/2002-04-04b.htm)

11.2 Vorträge

Neurologische Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg. 07. April 2005. Würzburg. Deutschland.

Brain endothelial cells as target for viral infections.

XIV. Measles Meeting. 23.-25. September, 2004. Würzburg. Deutschland.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mediates cell type specific anti-measles virus activity of interferon- γ .

3. Workshop. Society for Virology. Study Group "Immunobiology of Viral Infections". 15.-17. September, 2004. Schloss Zeilitzheim. Deutschland.

Indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) mediates cell type specific anti-measles virus activity of interferon- γ .

Institut für Virologie und Immunbiologie. 14. Juli, 2004. Würzburg. Deutschland.

Antiviral activity of indoleamine 2,3-dioxygenase.

Institut für Virologie und Immunbiologie. 14. Januar, 2004. Würzburg. Deutschland.

Interferon- γ induced indoleamine 2,3 dioxygenase (IDO) has anti-measles virus activity.

XIII. Measles Meeting. 12.-13. September, 2003. Würzburg. Deutschland.

The role of hydrocortisone for measles virus replication in endothelial cells and transmigration of infected leukocytes through polarized endothelial cells.

Sackler-Preise. 8. April, 2002. Salzburg. Österreich.

Investigation on the role of the hemagglutinin-esterase glycoprotein of murine coronavirus (MHV) during infection of CNS-cells and in viral sorting in polarized epithelial cells.

11.3 Posterpräsentationen

ECRIMS 2004, 20. Kongress des European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis. 06.-09. Oktober, 2004. Wien. Österreich (P328)
Ruprecht, K., **Obojes, K.**, Lassmann, H., Wengel, V., Schneider-Schaulies, J., Perron, H. und Rieckmann, P.

MRSV/HERV-W gag Protein: Expression in brain endothelium of acute multiple sclerosis lesions in situ and induction by viral infection in cerebral endothelial cells in vitro.

II. Europäische Virologie Kongress – Eurovirology. 05.-09. September, 2004. Madrid. Spanien. (P4-13)

Schneider-Schaulies, J., **Obojes, K.**, Andres, O., Kim, K.S. und Daeubener, W.
Interferon-gamma-induced indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) has cell type specific anti-measles virus activity.

Internationales Symposium Threat of Infection 25.-28. Juli, 2004. Würzburg. Deutschland. (P49)

Obojes, K., Daeubener, W. und Schneider-Schaulies, J.
Interferon-gamma induced indoleamine 2,3-dioxygenase (IDO) has anti-measles virus activity.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Joint meeting with Società Italiana di Virologia. 17.-20. März, 2004. Tübingen. Deutschland. (056)

Nicklass, S., **Obojes, K.** und Schneider-Schaulies, J.
Measles virus strain specific induction of cytokine expression in endothelial cells.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. Joint meeting with Società Italiana di Virologia. 17.-20. März, 2004. Tübingen. Deutschland. (055)

Obojes, K., Daeubener, W. und Schneider-Schaulies, J.
Interferon-gamma induced indoleamin 2,3 dioxygenase (IDO) has anti-measles virus activity.

Jahrestagung der Gesellschaft für Mikrozirkulation und Vaskuläre Biologie e.V. 16.-18. Oktober, 2003. München. Deutschland. (P-6)

Obojes, K., Andres, O., Kim, K.S. und Schneider-Schaulies, J.
Adverse effects of hydrocortisone and type I and II interferons on measles virus replication and transmigration of leukocytes through endothelial cells.

1. Symposium Infektion des Endotheliums. 09.-11. September, 2003. Dresden, Deutschland. (DFG SCH 320/9-1)

Andres, O., **Obojes, K.** und Schneider-Schaulies, J.

CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wildtype measles virus and effects of hydrocortisone and interferons on viral replication.

4. Symposium Biologie der Endothelzellen. 18.-20. Juli, 2003. München. Deutschland. (P58)

Obojes, K., Nicklass, S., Andres, O., Kim, K.S. und Schneider-Schaulies, J.

Impact of hydrocortisone on measles virus replication and viral induction of the immune response in endothelial cells.

4. Symposium Biologie der Endothelzellen. 18.-20. Juli, 2003. München. Deutschland. (P57)

Andres, O., **Obojes, K.**, Kim, K.S., ter Meulen, V. und Schneider-Schaulies, J.

CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses.

XII Interantionale Konferenz Negative Strand Viruses. 14.-19. Juni, 2003. Pisa. Italien. (013)

Andres, O., **Obojes, K.**, Kim, K.S., ter Meulen, V. und Schneider-Schaulies, J.

CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. 26.-29. März, 2003. Berlin. Deutschland. (REC 02)

Andres, O., **Obojes, K.**, Kim, K.S., ter Meulen, V. und Schneider-Schaulies, J.

CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses.

Internationale Union of Microbiological Societies World Congresses: The World of Microbes. 27. Juli – 01. August, 2002. Paris. Frankreich. (V-278)

Vlasak, R., Rinninger, A., Wurzer, W.J., **Obojes, K.**, Bauer, H.C., Kohla, G., Schauer, R., Richet, C., Pons, A., Mariller, C. und Zanetta, J.P.

The sialate-4-O-acetyltransferases of coronaviruses related to mouse hepatitis virus – a proposal to reorganize group 2 Coronaviridae.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. 08.-11. April, 2002. Erlangen. Deutschland. (P245)

Andres, O., **Obojes, K.**, Erlenhoefler, C. und Schneider-Schaulies, J.

Infection of endothelial cells with wildtype measles virus suggests the presence of an unknown cellular receptor.

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie. 08.-11. April, 2002. Erlangen. Deutschland. (P121)

Obojes, K., Wurzer, W.J., Mariller, C., Zanetta, J.P. und Vlasak, R.

The Hemagglutinin-Esterase surface glycoprotein of murine coronaviruses influences viral sorting and pathogenicity.

6. Internationale Symposium Positive Strand RNA Viruses. 28. Mai – 02. Juni, 2001. Institut Pasteur Paris. Frankreich. (P1-74)

Vlasak, R., **Obojes, K.**, Unger, U., Fuchs, R. und Bauer, H.C.

The HE protein is involved in apical sorting of murine coronaviruses.

3. Symposium Biologie der Endothelzellen. 24.-25. Mai, 2001. Giessen. Deutschland. (P-D1)

Andres, O., **Obojes, K.**, ter Meulen, V. und Schneider-Schaulies, J.

The interactions of human vascular endothelial cells with various measles virus strains.

Diese Arbeit wurde von der Deutschen Forschungsgemeinschaft (DFG) im Schwerpunktprogramm 1130: Infektionen des Endothels mit dem Thema: Untersuchung der Wechselwirkung von Endothelzellen mit attenuierten und virulenten Masernviren gefördert.

12 Danksagung

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies danke ich für die Betreuung und fachliche Korrektur der Doktorarbeit.

Herrn Prof. Dr. Georg Krohne möchte ich für die Übernahme des Zweit-Gutachtens seitens der biologischen Fakultät danken.

Herrn Prof. Dr. Volker ter Meulen danke ich für seine Vorbildfunktion als langjähriger Leiter des Institutes für Virologie und Immunbiologie.

Herrn Prof. Dr. Axel Rethwilm danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Virologie und Immunbiologie.

Herrn Prof. Dr. Walter Däubener und seinem Labor danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit am Institut für Medizinische Mikrobiologie in Düsseldorf.

Herrn Dr. Klemens Ruprecht mit seiner CTL Verena Wengel und Herrn Prof. Dr. Peter Rieckmann danke ich für die erfolgreiche Zusammenarbeit an der Neurologischen Klinik und Poliklinik des Universitätsklinikums Würzburg.

Herrn Malte Langenbach M.A. danke ich für die zusätzliche Korrektur.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen im JSS-Labor mit Frau Löffler und im Nachbarlabor bedanken. Ganz besonders möchte ich mich bei Dr. med. Oliver Andres für die erfolgreiche Zusammenarbeit bedanken und wünsche ihm trotz Schicksalsschlag viel Kraft für das Zusammenschreiben seiner Doktorarbeit.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich bei allen Höhen und Tiefen einer Promotion unterstützt hat. Weiterer Dank auch an Familie Wahler, die mir die fränkische Lebensweise näher gebracht hat.

Zuletzt danke ich Ingo ganz herzlich, der mich immer wieder motiviert und mich moralisch unterstützt hat.

VIELEN DANK an alle, die mir geholfen haben!