

Bedeutung der Glykoproteine für die Masernvirus-induzierte Immunsuppression

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

vorgelegt von

Sabine Streif
aus Pirmasens

Würzburg
2005

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Prof. Dr. V. ter Meulen

Gutachter: Prof. Dr. J. Kreft

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die Dissertation „Bedeutung der Glykoproteine für die Masernvirus-induzierte Immunsuppression“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, daß diese Dissertation noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Ich versichere, daß ich außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademische Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

München, 14. Februar 2005

Sabine Streif (geb. Gfrörer)

Inhaltsverzeichnis

1. Einleitung	1
1.1 Das Masernvirus	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Virusaufbau, Funktion der Virusproteine und MV-Rezeptoren .	1
1.2 Akute Masern	4
1.3 MV-induzierte Immunsuppression	4
1.4 Tiermodelle zur Untersuchung von MV-Infektionen	7
1.4.1 Affenmodell	7
1.4.2 Nagetiermodell	8
1.5 Transgene Mäuse mit Tetrazyklin-induzierbarem Expressionssystem ..	12
1.5.1 Tetrazyklin-Expressionssystem	13
1.5.2 Transgene Mäuse mit Tetrazyklin-induzierbarer gewebespezifischer Expression	16
1.6 Fragestellung	18
2. Material	20
2.1 Versuchstiere	20
2.1.1 Baumwollratten	20
2.1.2 Mäuse	20
2.2 Zelllinien	21
2.3 Virusstämme	21
2.4 Plasmide	22
2.5 Oligonukleotide	22
2.6 Antikörper und Antiseren	23
2.7 Radiochemikalien	23

2.8	Verbrauchsmaterial	23
2.9	Medien, Lösungen und Puffer	24
2.9.1	Zellkultur	24
2.9.2	Durchflußzytometrie	25
2.9.3	Proliferationstest	25
2.9.4	ICA-Färbung	25
2.9.5	Southern-Blot	26
2.9.6	ELISA	27
2.10	Geräte	27
3.	Methoden	29
3.1	Zellkultur.....	29
3.1.1	Haltung von adhärenenten Zellen	29
3.1.2	Haltung von Suspensionszellen	29
3.2	Molekularbiologische Methoden	29
3.2.1	Agarosegel-Elektrophorese	29
3.2.2	Polymerase-Ketten-Reaktion	30
3.2.3	Fällen von DNA	31
3.2.4	Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktions- Endonukleasen	31
3.2.5	Isolierung und Reinigung der DNA für die Mikroinjektion	32
3.2.6	Präparation genomischer DNA aus Mäuseohren	32
3.2.7	Arbeiten mit RNA	33
3.3	Southern-Blot	34
3.4	Transfektion	36
3.4.1	Stabile Transfektion mit FuGENE 6	36
3.4.2	Transiente Transfektion mit Lipofektin zur Herstellung von 293-F/H-Zellen	37
3.5	Chromfreisetzungstest	37
3.6	Immunologische Methoden	38
3.6.1	Durchflußzytometrie	38
3.6.2	Proliferationstest	39

3.6.3	ELISA	40
3.6.4	Neutralisationstest	42
3.6.5	Färbung von Zellen nach Pappenheim	42
3.7	Virologische Methoden	43
3.7.1	Virusanzucht von MGV	43
3.7.2	MGV-Plaquetest (ICA-Färbung)	43
3.7.3	Gewinnung von MGV-Antigen	44
3.7.4	Bestimmung der Proteinkonzentration	45
3.8	Tierexperimentelle Methoden	45
3.8.1	Intranasale Immunisierung	45
3.8.2	Intraperitoneale Injektion	46
3.8.3	Entnahme lymphoider Organe	46
3.8.4	Präparation von Milz-, Thymus- und Lymphknotenzellen	46
3.8.5	Blutentnahme und Serumgewinnung	46
3.8.6	Applikation von DNFB auf die Haut	47
4.	Ergebnisse	48
4.1	Etablierung und Charakterisierung eines neuen transgenen Mausmodells mit Tetrazyklin-induzierbarer gewebespezifischer Expression von Masernvirus-Glykoproteinen („TetOn“-System)	48
4.1.1	Experimentelle Strategie zur Herstellung und Testung von Masernvirus-Glykoproteinen-exprimierenden Mäusen	48
4.1.2	Herstellung der transgenen Mauslinien mit F und H von MV..	48
4.1.3	Genotypisierung der transgenen Mäuse mit Hilfe der PCR	52
4.1.4	Organisation der integrierten DNA im Genom	54
4.1.5	Auskreuzung der heterozygoten Mäuse zu homozygoten Linien	57
4.1.6	Analyse der Transkription in den transgenen Mäusen der Linien 1-4	58
4.1.7	Herstellung von doppelt-transgenen Mäusen mit Tetrazyklin-induzierbarer gewebespezifischer Expression von F und H	60
4.1.8	Analyse der Expression von F und H in doppelt-transgenen Mäusen	62

4.1.9	Zusammenfassung der transgenen Mauslinien 1, 2, 3 und 4	70
4.1.10	Auswirkungen der Expression von F und H in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3	71
4.1.10.1	Kinetik der Thymozytenzahl	71
4.1.10.2	Analyse der MV-spezifischen Immunantwort	72
4.1.10.3	Analyse der Induktion einer Immunsuppression	74
4.1.10.4	Infektion mit „Friend Virus“ während Langzeit-F/H-Expression	76
4.2	Etablierung eines Modells der Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp in der Baumwollratte und Suppression durch MV-Infektion	78
4.2.1	Charakterisierung der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen im DTH-Modell	78
4.2.1.1	Verhältnis von CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ T-Zellen während der primären DTH-Antwort	78
4.2.1.2	Funktion der CD4 ⁺ und CD8 ⁺ T-Zellen während der sekundären DTH-Antwort	81
4.2.2	Einfluß von MV auf das DTH-Modell	84
4.2.2.1	Einfluß von MV auf die primäre DTH-Antwort	84
4.2.2.2	Einfluß von MV auf die sekundäre DTH-Antwort ...	86
4.2.3	Immunaktivierung nach MV-Infektion	87
4.2.3.1	MV-induzierte Spontanproliferation	87
4.2.3.2	MV-spezifische B-Zellantwort	88
4.2.3.3	Aktivität der NK-Zellen	89
4.2.4	Mögliche Ursache der simultanen Entstehung einer Immunsuppression und Immunaktivierung nach MV-Infektion	90
5.	Diskussion	93
6.	Zusammenfassung	103
7.	Summary	106
	Literaturverzeichnis	109
	Abkürzungsverzeichnis	119
	Eigene Veröffentlichungen	124

1. Einleitung

1.1 Das Masernvirus

1.1.1 Taxonomie

Das humanpathogene Masernvirus (MV) gehört zur Familie der Paramyxoviridae, welche in die Unterfamilien Paramyxovirinae und Pneumovirinae unterteilt wird. Die Paramyxoviren besitzen ein unsegmentiertes einzelsträngiges RNA-Genom mit Minusstrangpolarität, und gehören somit der Ordnung Mononegavirales an. Alle Paramyxoviren haben den gleichen Partikelbau, ein durchgehendes RNA-Genom und werden über die gleichen Replikationsmechanismen vermehrt. Sie sind bei Mensch und Tier weit verbreitet und verursachen zum Teil schwere Erkrankungen.

Die Paramyxovirinae lassen sich aufgrund der Funktion ihrer Membranproteine in verschiedene Gattungen einteilen. Respiro-, Rubula- und Avulaviren besitzen eine Neuraminidase und ein Hämagglutinin. Morbilliviren besitzen ebenfalls ein Hämagglutinin, aber keine Neuraminidase. Zu dieser Gattung wird das MV und einige tierpathogene Verwandte gezählt, wie das Rinderpest- und Hundestaupevirus. MV ist das Virus, bei dem erstmals eine immunsuppressive Wirkung beschrieben wurde (1906, von Pirquet). Aber auch andere Morbilliviren, wie zum Beispiel das Rinderpestvirus, sind immunsuppressiv. Die Vertreter der zweiten Unterfamilie Pneumovirinae besitzen weder ein Hämagglutinin, noch eine Neuraminidase, und werden in die Gattungen Pneumo- und Metapneumovirus unterteilt.

1.1.2 Virusaufbau, Funktion der Virusproteine und MV-Rezeptoren

Die infektiösen Viruspartikel haben einen Durchmesser von etwa 150 bis 250 nm und eine pleomorphe, meist runde Gestalt. Sie bestehen aus einem Nukleokapsid, das von einer äußeren Membranhülle umgeben ist (Abbildung 1). Das helikale Nukleokapsid enthält das einzelsträngige Negativstrang-RNA-Genom mit einer Länge von 15,9 kb. Es bildet mit dem Largeprotein (L-Protein), Phosphoprotein (P-Protein) und Nukleokapsidprotein (N-Protein) einen Ribonukleoproteinkomplex (Lund et al., 1984). Das N-Protein ist die Hauptproteinkomponente des

Nukleokapsids und dient als Verpackung der viralen RNA. Jedes N-Protein bedeckt einen Abschnitt von ca. 6 Basen des MV-Genoms und schützt es vor dem Abbau durch Nukleasen. Zusätzlich ist es an der Initiation von Replikation und Transkription beteiligt (Gombart et al., 1993). Das L-Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer RNA-abhängigen RNA-Polymerase. Für diese Funktion ist seine Assoziation mit dem P-Protein erforderlich. Die Transkription und Replikation der viralen mRNA im Zytoplasma der infizierten Zelle wird von dem RNA-Polymerasekomplex gesteuert, der aus N-, P- und L-Proteinen gebildet wird.

Die Hülle des MV besteht aus Membranlipiden der Wirtszelle und drei viralen Proteinen. Das Fusionsprotein (F) und das Hämagglutinin (H) sind Oberflächenproteine und als Komplex in die Membran eingelagert. Das Matrixprotein (M-Protein) ist mit der Innenseite der Hülle verbunden (Alkhatib and Briedies, 1986). Das M-Protein spielt eine wichtige Rolle für die Reifung und den Austritt des Viruspartikels aus der Wirtszelle. Es interagiert mit den beiden Oberflächenproteinen und inhibiert die Transkription durch Kontakt mit dem Ribonukleoproteinkomplex (Suryanarayana et al., 1994).

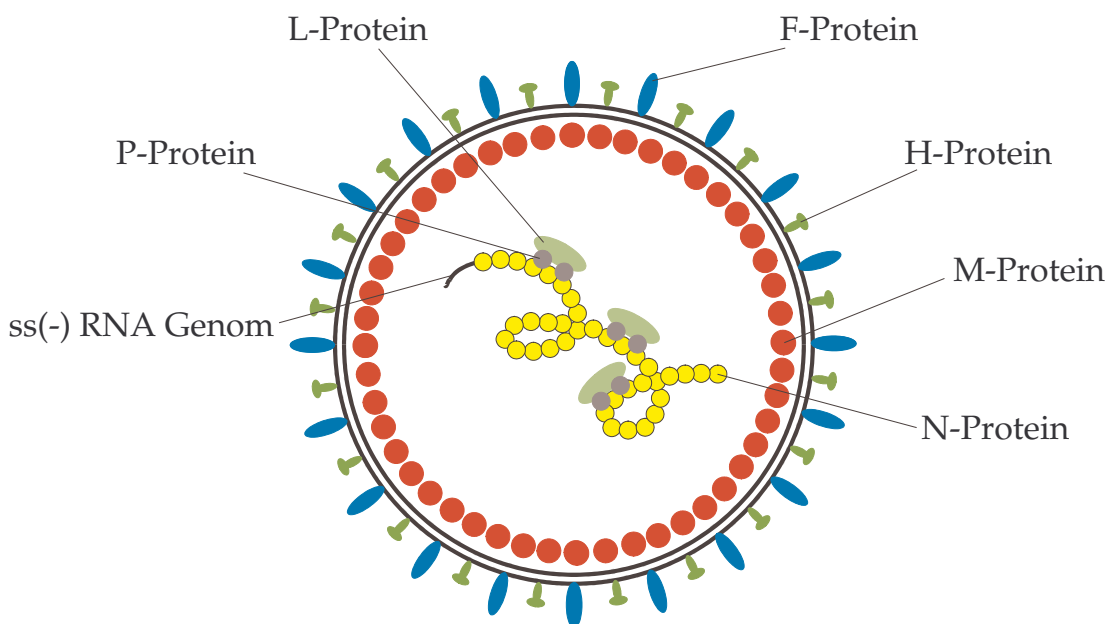


Abbildung 1: Schematische Darstellung des MV-Partikels.

Abkürzungen: F: Fusionsprotein; H: Hämagglutinin; L-Protein: Largeprotein; P-Protein: Phosphoprotein; M-Protein: Matrixprotein; N: Nukleokapsid.

Die Anheftung des Virus an die Rezeptoren der Wirtszelle erfolgt durch das Typ II-Glykoprotein H. Im Gegensatz dazu vermittelt das als Trimer vorliegende Typ I-Glykoprotein F die Verschmelzung der Virushülle mit der Wirtszellmembran. Es setzt sich aus einem F₁- und F₂-Teil zusammen, die aus einer inaktiven F₀-Vorstufe durch proteolytische Spaltung durch eine zelluläre Protease hervorgehen (Bolt and Pedersen, 1998). Durch diese Reaktion entsteht ein neuer hydrophober Aminoterminus am F₁-Teil, die Fusionsdomäne (Varsanyi et al., 1985; Richardson et al., 1986). Durch Bindung des tetrameren H-Proteins an einen zellulären Rezeptor wird eine Konformationsänderung des F₁-F₂-Heterodimers induziert. Dies führt zur Insertion der hydrophoben Fusionsdomäne in die Wirtszellmembran, wodurch die Fusion eingeleitet wird (Baker et al., 1999). Für die Verschmelzung der viralen Hülle mit der Wirtsmembran ist somit das Zusammenwirken beider Glykoproteine als Komplex notwendig.

Der erste identifizierte zelluläre Rezeptor des MV war das humane CD46-Molekül (Doerig et al., 1993; Nanche et al., 1993), das auf den meisten humanen kernhaltigen Zellen exprimiert wird. Dieses klassische Transmembranprotein gehört zur Familie der Komplementregulatoren. Es bindet die Komplementfaktoren C3b und C4b und inhibiert die Komplement-vermittelte Zellyse (Liszewski et al., 1991). Attenuierte MV-Impfstämme und Wildtypen, die an Verorzellen adaptiert sind, besitzen eine hohe Affinität für CD46. Nach Kontakt mit dem H-Protein kommt es zur Herunterregulation von CD46 auf der Oberfläche der infizierten Zelle (Schneider-Schaulies et al., 1995 a; Schneider-Schaulies et al., 1995 b). Als zweiter zellulärer Rezeptor des MV wurde das humane kostimulatorische CD150- oder SLAM-Molekül (signalling lymphocytic activation molecule) identifiziert (Tatsuo et al., 2000; Erlenhoefer et al., 2001). Dieses Molekül wird auf aktivierten T- und B-Zellen, Gedächtniszellen, aktivierten Monozyten und dendritischen Zellen exprimiert. CD150 wird ebenfalls während der Infektion oder nach Kontakt mit MV herunterreguliert und könnte für die MV-induzierte Immunsuppression verantwortlich sein (Erlenhoefer et al., 2001; Hsu et al., 2001). MV-Impfstämme nutzen CD150 und CD46 als Rezeptor. Im Gegensatz dazu binden MV-Wildtypstämme nur CD150. Mit Hilfe rekombinanter Viren konnte gezeigt werden, daß die Mutation des WTF H-Proteins an Position 481 und der dadurch ausgelöste Aminosäureaustausch von Asparagin zu Tyrosin (N481Y), eine veränderte Rezeptornutzung von CD150 zu CD46 verursacht (Erlenhoefer et al., 2002). Darüberhinaus wird noch ein weiterer unbekannter Rezeptor vermutet, da ein rekombinantes MV Endothelzellen infizieren kann, welche weder CD46 noch CD150 auf der Oberfläche exprimieren (Hashimoto et al., 2002). In den Nagetiermodellen Maus und Baumwollratte sind die MV-Rezeptoren nicht definiert.

1.2 Akute Masern

Das MV ist der Erreger der akuten Masern, einer weltweit verbreiteten hochkontagiösen Infektionskrankheit des Menschen. Masern ist eine der zehn häufigsten und der zehn tödlichsten Infektionskrankheiten weltweit. Trotz existierender Lebendvakzine gegen eine Infektion, erkranken weltweit jährlich 30-40 Millionen Menschen an Masern, und mehr als eine Million sterben an den Folgen dieser Erkrankung (World Health Report, 1999).

Das Virus wird aerogen als Tröpfcheninfektion übertragen (Riley et al., 1978). Nach einer Inkubationszeit von neun bis elf Tagen entwickeln MV-infizierte Kinder akute Masern mit Fieber, Husten, Schnupfen, Lichtscheue und Bindehautentzündungen (Modrow et al., 2003). Drei Tage später entstehen in der Mundschleimhaut die sogenannten Koplikschen Flecken (Koplik, 1896). Erst einen Tag danach tritt das MV-typische Exanthem auf. Hinter den Ohren beginnend breitet es sich innerhalb der nächsten zwei bis drei Tage über den gesamten Körper aus. Dieser Ausschlag wird durch die Zerstörung MV-infizierter Epithelzellen durch MHC-Klasse I-restringierte zytotoxische T-Zellen verursacht. Nach weiteren zwei bis drei Tagen geht das Exanthem zurück (Modrow et al., 2003). Bei einem Krankheitsverlauf ohne dieses Exanthem spricht man von „untypischen“ oder „weißen“ Masern. Die symptomatische Phase der Infektion dauert insgesamt ungefähr zehn Tage. Im Verlauf der Erkrankung bildet sich eine MV-spezifische Immunantwort aus, die lebenslang vor einer Reinfektion schützt.

In industrialisierten Ländern treten bei ca. 10 % der Infizierten Komplikationen wie Diarrhoe, Pneumonie oder Otitis Media auf (Clements and Cutts, 1995). Aufgrund von Unterernährung und einem geschwächten Immunsystem ist die Komplikationsrate in Entwicklungsländern wesentlich höher, und Pneumonie und Diarrhoe nehmen oft aufgrund von viralen, bakteriellen und parasitären Sekundärinfektionen einen tödlichen Verlauf. Ein weiterer Grund für die Empfänglichkeit für Sekundärinfektionen ist die MV-induzierte Immunsuppression (Morley, 1969). Seltene und besonders schwere Komplikationen sind die akute postinfektiöse Masernenzephalitis, sowie die stets letal verlaufende subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) (Modlin et al., 1977; Cosby et al., 2002) und die akute Einschlusskörperchen-Enzephalitis (MIBE) (Roos et al., 1981). Diese „slow virus“ Erkrankungen basieren auf einer persistierenden MV-Infektion der Neuronen und Gliazellen des Hirngewebes (Schneider-Schaulies et al., 1992).

1.3 MV-induzierte Immunsuppression

Eine Infektion mit MV löst zwei sehr gegensätzliche Immunreaktionen im Patienten aus. Neben einer effizienten MV-spezifischen Immunantwort, die zur vollständigen

Eliminierung des Virus und zum lebenslangem Schutz vor einer Reinfektion führt, induziert das Virus eine ausgeprägte Immunsuppression. Die erhöhte Empfänglichkeit von MV-infizierten Kindern für opportunistische Infektionen während der Infektion wird auf diese Immunsuppression zurückgeführt (Morley, 1969). Die Immunsuppression wird noch Monate nach einer überwundenen Infektion beobachtet (Katz et al., 1995). Ein erster Hinweis auf diese Immunmodulation war die Tatsache, daß die Tuberkulinreaktion während und nach einer MV-Infektion negativ ist (Pirquet, 1908; Fireman et al., 1969). Die Suppression dieser Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp spricht für eine Beeinträchtigung der zellvermittelten Immunität. Weiterhin kann es zur Reaktivierung von Tuberkulose (Tamashiro et al., 1987) und latenten Herpesvirusinfektionen kommen (Black et al., 1996). In der akuten Phase der MV-Infektion liegt eine ausgeprägte Leukopenie der peripheren Blutleukozyten (PBL) vor, die vor allem T-Zellen betrifft. Das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen bleibt dabei unverändert (Arneborn and Biberfeld, 1983). Vom Auftreten der ersten klinischen Symptome bis zum Verlassen des Exanthems (zweite bis vierte Woche nach der Infektion) wird eine Reduktion der Proliferation von PBL nach Mitogen- oder Antigenstimulation *ex vivo* beobachtet (Griffin, 1995). Nach Immunisierung mit MV-Lebendimpfstoff tritt diese reduzierte Proliferation nach Mitogenstimulation zwar auch auf, aber in geringerem Ausmaß (Hussey et al., 1996). Daher treten Sekundärinfektionen ausschließlich nach akuten Masern auf, nicht nach Vakzinierung. Ein weiterer Unterschied zwischen Wildtyp-Infektionen und Vakzinierung ist die starke Ausbreitung von Wildtypviren im gesamten Körper. Zeichen dafür sind die Koplikschen Flecke, das Exanthem, die Lymphknotenschwellungen, die Beteiligung des oberen und unteren Respirationstraktes, die Veränderungen des Elektroenzephalogramms und der MV-Nachweis im Urin (Katz et al., 1995).

In vivo sind nur wenige T- und B-Lymphozyten, sowie Makrophagen mit MV infiziert. Trotzdem sind mitogenstimulierte T- und B-Zellen in Gewebekultur gut infizierbar und weisen eine reduzierte Proliferation nach Mitogenstimulation auf (McChesney et al., 1987; McChesney et al., 1988; Yanagi et al., 1992). Dabei wirken Wildtypviren stärker proliferationshemmend als Impfstämme (Ilonen et al., 1988).

Der suppressive Mechanismus der Immunsuppression ist noch nicht vollständig geklärt, aber die Inhibition der Proliferation nach Mitogenstimulation wird auf die beiden viralen Glykoproteine F und H zurückgeführt. In Gewebekultur wurde festgestellt, daß der zytopathische Effekt von MV nicht der alleinige Auslöser der Proliferationshemmung sein kann, da die Inhibition schon durch Kontakt von UV-bestrahlten infizierten Zellen oder inaktiviertem MV mit PBL nach Mitogenstimulation induziert wird (Sanchez-Lanier et al., 1988; Schlender et al., 1996). Dabei reicht ein Verhältnis von infizierten Zellen zu PBL von 1:100 während einer 10-minütigen Kontaktzeit aus. Dieser Effekt wird durch die beiden viralen Glykoproteine F und H ausgelöst, die auf der Zelloberfläche exprimiert werden, da mit F und H transfizierte Zellen die Proliferation von PBL hemmen (Schlender et al.,

1996; Niewiesk et al., 1997 a). Im Gegensatz dazu wirkt das rekombinante Masernvirus MGv, in dem die Glykoproteine F und H durch das Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus ausgetauscht sind, *in vitro* nicht immunsuppressiv (Schlender et al., 1996). In Gewebekultur wird außerdem nach einer MV-Infektion oder einem Kontakt mit MV-infizierten Zellen in Lymphozyten ein Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase beobachtet (McChesney et al., 1987; Naniche et al., 1999; Schnorr et al., 1997). Dabei nehmen die Zellen an Volumen zu und steigern die Produktion von Gesamt-RNA, Histon B-RNA und MHC Klasse II-Molekülen. Für den Übertritt der Zellen von der G₁- in die S-Phase ist der Abbau des cytoplasmatischen Zellzyklusregulators p27 notwendig. Dieser Abbau ist in infizierten T-Zellen verzögert. Außerdem werden die für den Eintritt in die S-Phase benötigten Cycline D3 und E in geringeren Mengen produziert (Engelking et al., 1999). Die Arretierung in der G₀/G₁-Phase ist auf die Inhibition der Proteinkinase B/Akt zurückzuführen (Avota et al., 2001).

Nicht nur *in vitro*- sondern auch *in vivo*-Daten belegen, daß die MV-induzierte Immunsuppression auf die Expression beider Glykoproteine F und H zurückzuführen ist (Schlender et al., 1996; Niewiesk et al., 1997 a). Humane Fibroblasten, die nach Transfektion beide MV-Glykoproteine exprimieren, induzieren nach intraperitonealer Injektion in Baumwollratten eine Proliferationshemmung. Im Gegensatz dazu führt eine Infektion mit dem rekombinanten MV MGv, dem die Glykoproteine F und H von MV fehlen, zu keiner Immunsuppression. Ebenso haben Zellen, die nur F oder H exprimieren, keine immunsuppressive Wirkung (Niewiesk et al., 1997 a). Das zeigt, daß die viralen Glykoproteine F und H notwendig und ausreichend sind, eine Proliferationshemmung zu induzieren. Mit Hilfe von Zellzyklusanalysen wurde beobachtet, daß Lymphozyten von infizierten Baumwollratten den Zellzyklus viel langsamer durchlaufen, als Lymphozyten von nicht-infizierten Tieren (Niewiesk et al., 1999 a). Das bedeutet, daß der *in vitro* beschriebene Zellzyklusarrest (McChesney et al., 1987; Schnorr et al., 1997; Naniche et al., 1999) tatsächlich ein stark verzögerter Zellzyklus mit Akkumulation von Zellen in der G₀/G₁-Phase ist. Ebenso wurde die Inhibition der Proteinkinase B/Akt durch MV auch *in vivo* bestätigt (Avota et al., 2001).

Eine MV-Infektion hat nicht nur Auswirkungen auf B- und T-Zellen, sondern auch auf Makrophagen und dendritische Zellen, die als antigenpräsentierende Zellen eine wichtige Rolle bei der Immunantwort spielen. Es wird vermutet, daß MV-induzierte Veränderungen dieser immunologisch wichtigen Zellen die Regulation des Immunsystems beeinflussen, wodurch es zur Immunsuppression kommen könnte. Es wäre denkbar, daß die Expression von Interleukin-12 (IL-12) dabei eine wichtige Rolle spielt.

Mit MV-infizierte Makrophagen sezernieren *in vitro* weniger IL-12 und Tumornekrosefaktor (Ward et al., 1991; Karp, 1999). Sie zeigen außerdem eine erhöhte Expression von MHC Klasse II-Molekülen bei einer normalen MV-Antigenpräsentation, obwohl die Präsentation von Kontrollantigenen gestört ist

(Leopardi et al., 1993). In Gewebekultur zeigen infizierte dendritische Zellen (DC) nach Stimulation ebenfalls eine Reduktion der IL-12-Sekretion (Grosjean et al., 1997; Fugier-Vivier et al., 1997; Klagge et al., 2000). Diese mehrfach berichtete Reduktion der IL-12-Synthese durch DC und Makrophagen nach einer MV-Infektion könnte ein Hinweis darauf sein, daß die Entwicklung einer T-Helfer-Zellantwort vom Typ 1 (TH1) durch MV gehemmt wird und somit eine T-Helfer-Zellantwort vom Typ 2 (TH2) gefördert wird. IL-12 ist ein Cytokin, das die Entwicklung von TH1-Zellen fördert und die Produktion von Interferon- γ durch die T-Zelle stimuliert (Delespese et al., 1997). Allerdings ist IL-4 dominant über IL-12 und induziert einen Wechsel von TH1- zu TH2-Zellen, indem es die IL-12-Synthese und die Produktion des IL-12-Rezeptors inhibiert (Nakamura et al., 1997; Paludan, 1998).

Es wurde postuliert, daß die Ausbildung einer TH2-dominierten Immunantwort, welche die zelluläre Immunität unterdrückt und dadurch die Empfänglichkeit für Sekundärinfektionen erhöht, die Ursache für die MV-induzierte Immunsuppression ist (Griffin et al., 1994). Diese Hypothese wird durch verschiedenste Daten gestützt. Vor und während des Exanthems wird im Patientenserum eine hohe Konzentration an Interferon- γ festgestellt (Griffin et al., 1990 a; Okada et al., 2001), was auf eine TH1-Antwort hinweist. Nach Abklingen des Ausschlages wird eine erhöhte Menge an IL-4 und löslichem CD4 beobachtet, während die Interferon- γ -Konzentration wieder normale Werte erreicht. Dies wurde als Hinweis auf eine TH2-Antwort interpretiert (Griffin and Ward, 1993), die möglicherweise wenig effizient gegen eine Virusinfektion ist. Im Gegensatz dazu sprechen andere Untersuchungen für die Entwicklung einer TH1-Antwort nach MV-Infektion (Pauksen et al., 1997).

1.4 Tiermodelle zur Untersuchung von MV-Infektionen

Der Mensch ist der einzige natürliche Wirt des MV. Da MV-Infektionen jedoch in ihren schweren Verlaufsformen hauptsächlich bei kleinen Kindern auftreten, sind klinische Studien am Patienten schwierig. Zur Untersuchung der MV-induzierten Immunsuppression und Entwicklung eines neuen Impfstoffes ist deshalb ein geeignetes Tiermodell erforderlich. Aus diesem Grund wurden sowohl Affen als auch Nagetiere auf ihren Einsatz für die MV-Forschung überprüft.

1.4.1 Affenmodell

Affen sind ein geeignetes Tiermodell zur *in vivo*-Untersuchung der Pathogenese, da nur diese Tiere, wie der Mensch, nach einer Infektion an Masern erkranken. Sie entwickeln eine dem menschlichen Masernpatienten ähnliche Erkrankung (Kobune et al., 1996). Primaten wurden vor allem zur Untersuchung von Impfstoffen (van Binnendijk et al., 1995; Zhu et al., 1997) und atypischen Masern (Polack et al., 1999) eingesetzt. Es konnte gezeigt werden, daß die MV-induzierte Immunsuppression

wie beim Menschen nach einer Wildtypinfektion stärker ausgeprägt ist, als nach Immunisierung mit einem Impfstamm (Auwaerter et al., 1999). Aus finanziellen und ethischen Gründen ist der Einsatz von Affen in der MV-Forschung allerdings stark eingeschränkt. Zusätzlich wird ihre Nutzung durch das Fehlen von Inzuchttieren und ein geringes Angebot an Tieren erschwert.

1.4.2 Nagetiermodelle

Baumwollratte (*Sigmodon hispidus*)

Baumwollratten sind für viele Viren empfänglich, die im Menschen Erkrankungen des Respirationstraktes auslösen, wie zum Beispiel das respiratorische Synzytialvirus (Byrd and Prince, 1997). Außerdem sind sie für Adeno-, Influenza- und Parainfluenzaviren empfänglich (Faith et al., 1997). Sie sind die einzigen Nagetiere, in denen eine MV-Replikation nach intranasaler Infektion im Respirationstrakt nachgewiesen werden konnte. Sowohl Impfstämme, als auch Wildtypviren replizieren bis zu 10 Tage nach der Infektion im Lungengewebe (Wyde et al., 1999; Wyde et al., 1992), wobei die höchsten Titer an Tag 4 und 5 gefunden wurden (Niewiesk et al., 1997 a). MV-Wildtypstämme wurden ebenfalls aus drainierenden Lymphknoten isoliert. Mit Hilfe der Polymerasekettenreaktion kann zwar aus anderen Organen virale RNA nachgewiesen werden, aber durch Kokultivierung kein infektiöses Virus. Das klinische Bild einer MV-Infektion ist in Baumwollratten unauffällig. Die Tiere weisen zwar eine reduzierte Aktivität auf, aber ihr Fluchtreflex ist unverändert und es kommt zu keinem Gewichtsverlust. Histologische Analysen zeigen eine bronchusassoziierte interstitielle Pneumonie mit nekrotischen Läsionen, die 6 und 8 Tage nach der Infektion am stärksten ausgeprägt sind (Niewiesk and Germann, 2000). Die nachfolgende Ausheilung des Lungengewebes korreliert mit einem Anstieg an MV-neutralisierenden Antikörpern und einer Abnahme des Virustiters.

Nach einer Infektion mit MV wird die spezifische Immunantwort gegen das Virus aktiviert. MV-spezifische IgG-Antikörper sind 8 Tage nach einer Infektion im Blut der Tiere nachweisbar, während neutralisierende Antikörper erst 4 Tage später zu finden sind (Niewiesk and Germann, 2000). Bereits eine Woche nach Immunisierung mit dem Impfstamm sind Baumwollratten vor einer Reinfektion geschützt (Schlereth et al., 2000). Die Ausbildung einer MV-spezifischen Immunantwort, die zur Ausheilung der Infektion und protektiver Immunität führt, weist auf eine ausgeprägte Immunaktivierung hin. Doch gleichzeitig kommt es infolge der MV-Infektion zu einer Immunsuppression, ähnlich wie beim Menschen.

Isolierte periphere Blutlymphozyten von MV-infizierten Personen zeigen in Gegenwart von Mitogenen eine stark reduzierte Proliferation *ex vivo*. Diese inhibierte Proliferation, die als Parameter für die Immunsuppression verwendet

wird, beobachtet man auch bei Baumwollratten. Milzzellen von MV-infizierten Tieren weisen 3 bis 7 Tage nach Infektion in Gegenwart von Mitogenen eine stark reduzierte T-Zellproliferation auf, die an Tag 4 am stärksten ist (Niewiesk et al., 1997 a; Niewiesk, 1999 b). Die Immunsuppression wird *in vivo* und *in vitro* durch die gleichzeitige Expression der MV-Glykoproteine F und H ausgelöst (Schlender et al., 1996; Niewiesk et al., 1997 a). Diese Glykoproteine sind sowohl notwendig, als auch ausreichend, um eine Immunsuppression auszulösen. Nach intraperitonealer Injektion von F- und H-exprimierenden Fibroblasten wurde die *ex vivo* Proliferation von mitogenstimulierten Milzzellen inhibiert (Niewiesk et al., 1997 a). Auffallend ist, daß diese Proliferationshemmung nach intranasaler Infektion von Baumwollratten mit der applizierten Virusdosis korreliert, und daß Wildtypviren im Vergleich zu Impfstämmen deutlich stärker proliferationshemmend sind. Impfstämme induzieren außerdem nur in viel höherer Dosierung eine vergleichbare Proliferationshemmung (Pfeuffer et al., 2003). So war nach intranasaler Infektion mit 10^5 TCID₅₀ WTF am Tag 4 die Proliferation bis zu 40 % inhibiert, nach Infektion mit der gleichen Menge Edmonston wurde allerdings keine Hemmung beobachtet. Weiterhin war eine 1000-fach niedrigere Dosis an WTF ausreichend, um die gleiche hemmende Wirkung wie mit Edmonston zu erzielen. Dieser unterschiedliche immunsuppressive Effekt zwischen WTF und Edmonston weist auf eine Nutzung analoger Rezeptormoleküle hin.

Die unterschiedliche Fähigkeit von MV-Wildtyp und Impfstamm bei der Auslösung der Proliferationshemmung wurde mit einem rekombinanten MV weiter analysiert, bei dem die Glykoproteine F und H des Impfstammes Edmonston durch F und H des Wildtyps WTF ausgetauscht waren. Die *ex vivo* Proliferation der Milzzellen war nach intranasaler Infektion mit dem rekombinanten MV viel stärker supprimiert, als nach Infektion mit dem Impfstamm (Dissertation von Joanna Pfeuffer, 2002). Diese Studie zeigt, daß es zwischen den Wildtyp-Glykoproteinen WTF-F und -H und den Glykoproteinen F und H des Impfstammes Edmonston einen großen Unterschied in der Fähigkeit, eine Proliferationshemmung auszulösen, gibt.

Ein weiteres Zeichen der MV-induzierten Immunsuppression ist die Inhibition der Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp (=DTH-Reaktion, delayed type hypersensitivity) gegen Dinitrofluorobenzen (DNFB). Im MV-infizierten Menschen ist dies vergleichbar mit der Hemmung der DTH-Reaktion gegen Tuberkulin (Pirquet, 1908; Fireman et al., 1969). DNFB ist ein Hapten und wirkt nach Bindung an schwefelhaltige Proteine als starkes T-Zellantigen. Nach Applikation von DNFB auf die Ohrhaut von Tieren wird DNFB durch dendritische Zellen aufgenommen. Diese wandern zu den drainierenden Lymphknoten, präsentieren dort das Antigen und stimulieren somit die Proliferation von DNFB-spezifischen T-Zellen. Es entsteht die sogenannte primäre DTH-Antwort.

In Baumwollratten wurde gezeigt, daß die primäre DNFB-Antwort durch MV unterdrückt wird (Niewiesk et al., 2000; Avota et al., 2001). An drei aufeinanderfolgenden Tagen wurde eine 1 %-ige DNFB-Lösung auf jeweils ein Ohr der Baumwollratten aufgetragen. Es wurden nicht-infizierte und infizierte Tiere

eingesetzt, die drei Tage vor der Sensibilisierung mit MV infiziert wurden. Ein Tag nach der Sensibilisierung wurde die Proliferation der Lymphozyten der drainierenden Lymphknoten gemessen. Als Maßstab für die Proliferation wurde *in vitro* radioaktives Methyl-³H-Thymidin zugegeben. Die Radioaktivität wurde über Nacht in die DNA der stimulierten Lymphozyten eingebaut und danach gemessen. Sechs Tage nach der Infektion war die DNFB-spezifische Proliferation der Lymphozyten infizierter Tiere statistisch signifikant geringer, verglichen mit nicht-infizierten Tieren (Niewiesk et al., 2000). In einem weiteren Versuch wurden Baumwollratten verwendet, die am dritten Tag der Sensibilisierung bzw. 3 und 10 Tage vor der Sensibilisierung mit MV infiziert wurden. Einen Tag nach der Sensibilisierung wurden die Lymphozyten auf eine DNFB-spezifische Proliferation untersucht. Auch hier war die Proliferation 6 Tage nach der Infektion reduziert, nicht aber einen Tag oder 13 Tage nach der Infektion (Avota et al., 2001). Diese Studien zeigen, daß die primäre DNFB-spezifische T-Zellproliferation während der akuten Phase der Infektion (Tag 6) reduziert wurde, aber nicht in der frühen und späten Phase (Tag 1 und 13). Die T-Zellzusammensetzung während dieser primären DTH-Reaktion war in der Baumwollratte nicht bekannt, ganz im Gegensatz zum Mausmodell. Hier wurde das kutane Hypersensitivitätsmodell mit DNFB bereits etabliert. In ruhenden Lymphknoten beträgt das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen etwa 2:1. Nach Auftragung von DNFB auf die Haut der Mäuse und einer dadurch ausgelösten primären DTH-Antwort, verschiebt sich dieses Verhältnis in Richtung CD8⁺ T-Zellen und beträgt ca. 1:2.

Im Gegensatz zur primären DTH-Antwort ist die sekundäre Antwort in der Baumwollratte noch nicht untersucht worden. Sie kann durch zweimalige Applikation von DNFB auf verschiedene Hautbereiche ausgelöst werden. Die erste Applikation von DNFB auf die Flanke von Mäusen induziert die Entwicklung von DNFB-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Bour et al., 1995; Kehren et al., 1999). Nach sekundärem Kontakt mit DNFB auf die Ohrhaut wandern diese Zellen zum Ohr und induzieren eine Schwellung des DNFB-behandelten Ohres. Die Entwicklung der CD8⁺ T-Zellen ist allerdings unabhängig von CD4⁺ T-Zellen (Desvignes et al., 1996). DNFB-spezifische CD4⁺ T-Zellen setzen die DNFB-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort herab, da nach Depletion der CD4⁺ T-Zellen die Ohrschwellung ansteigt (Bour et al. 1995). Diese Studien an Mäusen zeigen, daß CD8⁺ T-Zellen während der sekundären DNFB-Antwort als Effektorzellen fungieren, die CD4⁺ T-Zellen übernehmen eine regulatorische Funktion. Im Gegensatz zum Mausmodell war in der Baumwollratte die Funktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen während der DTH-Reaktion nicht bekannt; ebenfalls der Einfluß von MV auf die sekundäre DNFB-Antwort. In Mäusen wurde nach intraperitonealer Injektion von UV-inaktiviertem MV eine leichte Reduktion der Ohrschwellung festgestellt. Das gleiche Phänomen wurde nach Injektion des N-Proteins von MV beobachtet. Das UV-inaktivierte rekombinante MV MGV induziert ebenfalls eine schwache Suppression der Hypersensitivitätsreaktion (Marie et al., 2001).

Durch die Baumwollratte steht der MV-Forschung ein Nagetiermodell zur Verfügung, das intranasal sowohl mit MV-Impfstamm als auch Wildtypviren infizierbar ist, eine MV-spezifische Immunantwort ausbildet und eine MV-induzierte Immunsuppression entwickelt. Baumwollratten haben allerdings den Nachteil, daß noch keine „knock out“ oder transgenen Tiere auf dem Markt erhältlich sind und die Haltung und Zucht problematisch ist. Dieses Tiermodell ist außerdem immunologisch und genetisch weniger gut charakterisiert, als das Mausmodell. Zur Analyse der MV-induzierten Immunsuppression und MV-Pathogenese wäre daher ein alternatives oder zusätzliches Tiermodell wünschenswert, das immunologisch und genetisch gut charakterisiert ist, wie zum Beispiel transgene Mäuse.

Maus

Mit Ausnahme der Baumwollratte sind Nagetiere für eine Infektion des Respirationstraktes mit MV nicht empfänglich. Nur durch intrazerebrale Inokulation eines neurotrophen, an Nagetiere adaptierten MV, kann eine Enzephalitis in Ratte (Liebert and ter Meulen, 1987), Maus (Griffin et al., 1974) oder Hamster (Burnstein et al., 1963) induziert werden. Andere Applikationsarten führen zu keiner Infektion. Allerdings repliziert das MV nach Infektion des Zentralnervensystems (ZNS) nur im Gehirn, und nicht außerhalb des ZNS. Es wird vermutet, daß das Virus die Zellen des ZNS dieser Nagetiere über einen noch nicht identifizierten Rezeptor *in vivo* infizieren kann.

Im Mausmodell der akuten MV-induzierten Enzephalitis (MVE) kann man resistente und empfängliche Mausstämme unterscheiden (Niewiesk et al., 1993). Die Empfänglichkeit oder Resistenz gegen die MVE korreliert mit dem MHC-Haplotyp. Mäuse empfänglicher Inzuchtstämme können durch intrazerebrale Infektion mit einem neurotrophen, an Nagetiere adaptierten MV (Stamm CAM/RBH) infiziert werden. Sie entwickeln nach 5-8 Tagen eine akute Enzephalitis, die 1-2 Tage später letal endet (Niewiesk et al., 1993). Ein großer Nachteil dieses MVE-Modells ist, daß die MV-Replikation nur im Gehirn stattfindet und sich das Virus nicht in der Peripherie ausbreitet.

In Mäusen wird, wenn überhaupt, eine nur schwache Immunsuppression durch MV ausgelöst. Nach intrazerebraler Infektion von enzephalitisresistenten Balb/c-Mäusen und empfänglichen C3H-Mäusen, und nach Mitogenstimulation der Milzzellen, ist die T-Zellproliferation von infizierten und nicht-infizierten Tieren identisch (Habilitationsschrift von Stefan Niewiesk, 2000). Im Gegensatz dazu wurde durch intraperitoneale Injektion von MV eine geringe Proliferationshemmung in C3H-Mäusen induziert. In Balb/c-Mäusen wurde keine Proliferationshemmung festgestellt (Habilitation von Stefan Niewiesk, 2000). Eine schwache Immunsuppression ohne MV-Replikation wurde in C57BL/6-Mäusen beobachtet. Nach intraperitonealer Injektion von UV-inaktiviertem MV wurde die Hypersensibilitätsreaktion gegen DNFB leicht supprimiert (Marie et al., 2001).

Die Expression des humanen CD46-Moleküls erhöhte die Empfänglichkeit von bestimmten Nagetierzellen für den MV-Impfstamm Edmonston. Daher wurden CD46-transgene Mäuse und Ratten auf ihren Einsatz für die MV-Forschung überprüft (Horvath et al., 1996; Niewiesk et al., 1997 b, Mrkic et al., 1998). Jedoch repliziert das Virus in beiden Modellen nur im Gehirn, ohne Ausbreitung in der Peripherie (Liebert and ter Meulen, 1987), da ein intrazellulärer Block die Replikation außerhalb des ZNS verhindert (Horvat et al., 1996; Rall et al., 1997; Niewiesk et al., 1997 b; Blixenkron-Möller et al., 1998; Mrkic et al., 1998). In CD46-transgenen Ratten wurde keine Immunsuppression durch intraperitoneale oder intratracheale Infektion induziert (Habilitationsschrift von Stefan Niewiesk, 2000). Die Hypersensitivitätsreaktion gegen DNFB wurde in CD46-transgenen Mäusen, je nach eingesetztem MV, unterschiedlich stark supprimiert. So wurde die DTH-Reaktion nach intraperitonealer Injektion von UV-inaktiviertem MV stark unterdrückt (Marie et al., 2001).

Die bisher vorgestellten Mausmodelle können nur selektiv für Pathogenesestudien von MV-Infektionen verwendet werden, da eine intranasale Infektion zu keiner Virusreplikation und Ausbreitung im Respirationstrakt führt. Zusätzlich wird in nicht-transgenen Mäusen eine schwache bzw. keine Immunsuppression ausgelöst. Daher können diese Tiere nicht zur Analyse der MV-induzierten Immunsuppression eingesetzt werden.

CD46-transgene Mäuse sind trotz induzierbarer Immunsuppression ebenfalls für die Analyse der MV-induzierten Immunsuppression ungeeignet, da das CD46-Molekül der MV-Rezeptor für Impfstämme ist und es aufgrund des immunsuppressiveren Effekts der Glykoproteine von MV-Wildtyp WTF, verglichen mit den Glykoproteinen des Impfstammes Edmonston, notwendig ist, Einblicke in Wildtyp-Infektionen zu gewinnen. Diese Probleme könnten durch die Verwendung konditionell transgener Tiere umgangen werden, welche die für die Immunsuppression verantwortlichen MV-Glykoproteine WTF-H und WTF-F in einem murinen transgenen Tiermodell regulierbar exprimieren. Mit diesem Modell könnten die Parameter, die für die MV-induzierte Immunsuppression von Bedeutung sind, in einem immunologisch gut charakterisierten Organismus untersucht werden. Eine Möglichkeit wären beispielsweise transgene Mäuse mit Tetrazyklin-induzierbarer Expression von WTF-F und WTF-H.

1.5 Transgene Mäuse mit Tetrazyklin-induzierbarem Expressionssystem

Transgene Mäuse enthalten ein experimentell eingeführtes Gen stabil in ihrer Keimbahn und geben dieses an ihre Nachkommen weiter. Jedoch ist die ständige An- oder Abwesenheit eines Proteins häufig für den Fötus tödlich. Selbst wenn der Fötus überlebt, kann das Fehlen eines Proteins für die Entwicklung eines ganzen

Organismus fatale Folgen haben. Homozygote knock out-Mäuse sterben oft bereits *in utero*, weil die Entwicklung des Embryos massiv gestört wird. Diese Probleme kann man mit induzierbaren Säugerexpressionssystemen umgehen. Ein Beispiel dafür ist das sogenannte Tetrazyklin-Expressionssystem von Gossen und Bujard (Gossen and Bujard, 1992).

1.5.1 Tetrazyklin-Expressionssystem

Das von Gossen und Bujard entwickelte Tetrazyklin-Expressionssystem (Gossen and Bujard, 1992), kurz „Tet-System“ genannt, ermöglicht eine Tetrazyklin-regulierbare Expression eines gewünschten Gens, die an- und wieder ausgeschaltet werden kann. Ursprünglich wurde das Tet-System für die Zellkultur entwickelt. Der genetische „switch“ funktioniert in einer Vielzahl von eukaryotischen Zellen, einschließlich Säuger (Gossen and Bujard, 1992; Gossen et al., 1995), Pflanzen (Weinmann et al., 1994) und Hefen (persönliche Mitteilung von E. Gari an U. Baron in Baron et al., 1995). Aber auch auf dem Niveau von Organismen ermöglicht das Tet-System eine effektive Kontrolle der Genaktivität, wie zum Beispiel in Pflanzen (Weinmann et al., 1994), *Drosophila* (persönliche Mitteilung von W. Gehring an U. Baron in Baron et al., 1995) und Mäusen (Kistner et al., 1996). Abhängig von den verwendeten Promotoren wird die Genexpression in transgenen Mäusen auch gewebespezifisch induziert (Kistner et al., 1996).

Es existieren zwei verschiedene Varianten des Tet-Systems, das TetOff- und TetOn-System. Bei dem TetOff-System wird die Genexpression durch Tetrazyklin oder dessen Derivat Doxyzyklin ausgeschaltet, im Gegensatz dazu wird das TetOn-System durch das Antibiotikum Doxyzyklin effizient angeschaltet (Gossen et al., 1995).

Das Tet-System besteht aus zwei Komponenten, einem Regulatorplasmid und einem Antwortplasmid (Abbildung 2). Es basiert auf zwei regulatorischen Elementen des Tn10-spezifizierten Tetrazyklinresistenz-Operons von *Escherichia coli* (Hillen and Wissmann, 1989) - Tetrazyklin-Repressor und Tetrazyklin-Operator-Sequenz. Im folgenden Abschnitt wird das TetOn-System beschrieben.

Das Regulatorplasmid kodiert für den reversen Tetrazyklin-abhängigen Transkriptionsaktivator rtTA, ein Fusionsprotein aus dem mutierten bzw. reversen Tetrazyklin-Repressor (rtetR) und der C-terminalen VP16-Aktivierungsdomäne des Herpes simplex-Virus (AD) (Abbildung 2). Diese Domäne ist essentiell für die Transkription der „immediate early viral“ Gene (Triezenberg et al., 1988). Der Aktivator rtTA steht unter Kontrolle eines Promotors des Cytomegalievirus (CMV) und wird daher konstitutiv exprimiert (Gossen et al., 1995). Dieser Promotor kann in transgenen Mäusen durch gewebespezifische Promotoren ausgetauscht werden, um eine gewebespezifische Expression auszulösen (Kistner et al., 1996). In Anwesenheit von Doxyzyklin bindet rtTA an das Transaktivator-abhängige

Element (TRE)¹, welches auf dem Antwortplasmid lokalisiert ist und sieben „direct repeats“ der 42-bp Tetrazyklin-Operator-Sequenz enthält. TRE ist wiederum mit einem „minimal immediate early“ Promotor des CMV (= rtTA-abhängiger Promotor²) fusioniert, der ohne Aktivierung inaktiv ist. Erst nach Bindung des Transaktivators an TRE wird dieser Promotor aktiviert und es findet eine Transkription des nachgeschalteten Gens statt. Das Ergebnis ist eine Doxyzyklin-induzierte Expression eines gewünschten Gens (Gossen et al., 1995).

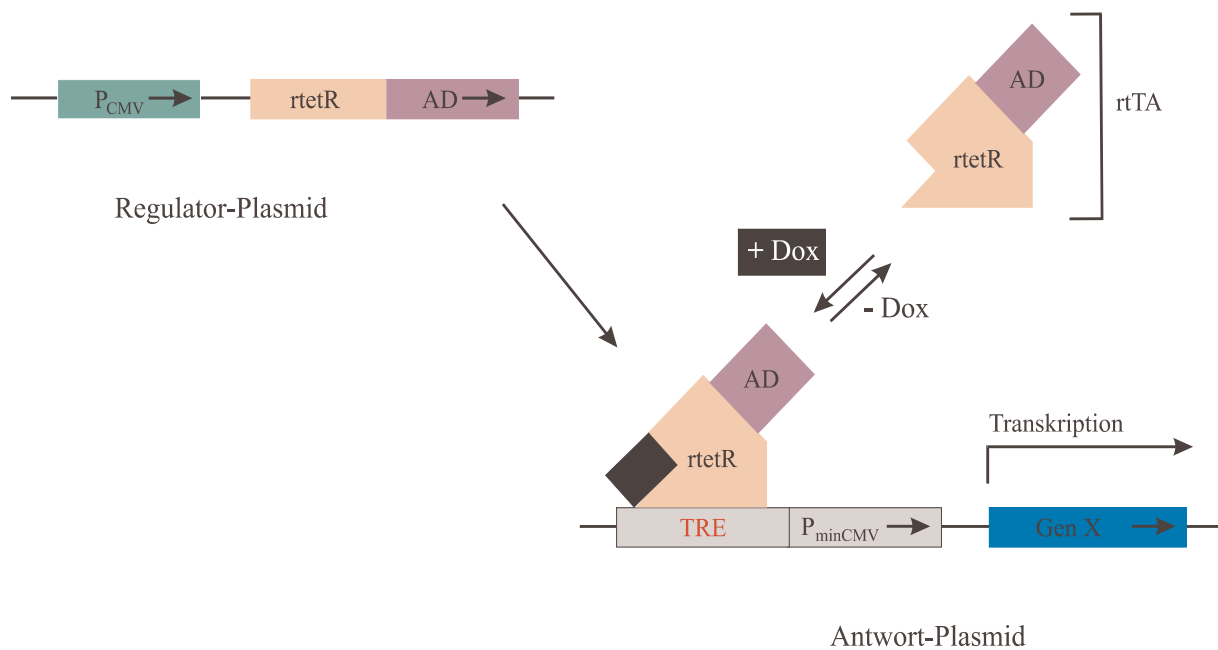


Abbildung 2: Schematische Darstellung des TetOn-Systems.

Abkürzungen: TRE: Transaktivator-abhängiges Element; P_{minCMV} : Minimalpromotor von Zytomegalievirus; Gen X: beliebiges Gen; rtTA: reverser Tetrazyklin-abhängiger Transkriptionsaktivator; P_{CMV} : Promotor von Zytomegalievirus; *rtetR*: reverser Tetrazyklin-Repressor; AD: Aktivierungsdomäne; Dox: Doxyzyklin.

Der genetische Unterschied zwischen den beiden Tet-Systemen besteht allein im Tetrazyklin-Repressor. Das TetOff-System arbeitet mit dem natürlich vorkommenden Tetrazyklin-Repressor (*tetR*) von *E. coli*. Nur in Abwesenheit von Tetrazyklin oder Doxyzyklin bindet dieser an den Transaktivator-abhängigen Promotor (Gossen and Bujard, 1992). Nach Mutation des *tetR* um 4 Aminosäuren

¹ Der in der Literatur verwendete Begriff Tetrazyklin-abhängiges Element TRE wird in dieser Arbeit mit rtTA- oder Transaktivator-abhängiges Element bezeichnet, da diese Bezeichnung die Eigenschaft von TRE exakter beschreibt.

² Der TRE-fusionierte Promotor wird in dieser Arbeit mit rtTA- oder Transaktivator-abhängiger Promotor bezeichnet.

entsteht der reverse Tetrazyklin-Repressor (rtetR), dessen Antibiotikaabhängigkeit komplett verändert ist. Nur in Anwesenheit von Doxyzyklin findet eine Aktivierung des rtTA-abhängigen Promotors statt (Hillen and Berens, 1994; Gossen et al., 1995).

Vorteile des Tet-Systems

Ein großer Vorteil des Tet-Systems ist seine höchst effiziente Regulation der Genaktivität. In beiden Tet-Systemen ist die Aktivierung bzw. Inaktivierung der Transkription von der verwendeten Antibiotikamenge abhängig. Daher lässt sich die Expression des Konstrukts einfach und elegant um einen Faktor 1000 und mehr erhöhen oder vermindern. Das Expressionsniveau ist im On-Zustand ebenfalls sehr hoch. Nach Integration des Gens, das für das Indikatorenzym Luziferase codiert, unter Kontrolle eines tTA-abhängigen Promotors in tTA-produzierende HeLa-Zellen, wurde eine starke Luziferaseaktivität *in vitro* beobachtet. Je nach eingesetzter Tetrazyklin-Konzentration (von 1 bis zu 0 µg/ml) stieg die Luziferaseaktivität in diesem TetOff-System auf das 10⁵-fache an (Gossen and Bujard, 1992). Mit dem TetOn-System wurde eine 1000-fache Steigerung der Luziferaseaktivität bei einer Doxyzyklinmenge von 0 bis 1 µg/ml *in vitro* beschrieben (Gossen et al., 1995). Diese dosisabhängig induzierte Expression funktioniert in transgenen Mäusen ebenfalls sehr gut (Kistner et al., 1996; Legname et al., 2000). Ein weiterer Vorteil dieses Systems ist seine reversible Funktionalität, im Gegensatz zu anderen induzierbaren Säugerexpressionssystemen, wie zum Beispiel das Cre/loxP-System. Dieses System wird eher angewandt, um Mausgenome *in vivo* und *in vitro* zu manipulieren (Boer et al., 2003). In Studien an transgenen Mäusen, die alle Elemente des TetOn-Systems (sogenannte TetOn-Mäuse) und das Interleukin-11-Gen enthalten, sank schon 24 Stunden nach Doxyzyklin-Entzug das Protein-Niveau von IL-11 signifikant um ca. 80 % (Ray et al., 1997). Die Transkription und Translation von IL-11 konnte in diesen Tieren ohne jegliche Dämpfung des Tet-Systems an-, aus- und erneut angeschaltet werden.

Das Tet-System gewährleistet außerdem eine schnelle Expressionsinduktion durch das Antibiotikum. In Zellkultur wurde schon 5,5 Stunden nach Zugabe von Doxyzyklin eine 100-fache Steigerung der Luziferaseaktivität beobachtet (TetOn-System). Das Maximum an Aktivität wurde in weniger als 24 Stunden erreicht (Gossen et al., 1995). Ähnlich verhält es sich *in vivo*. Nach Verabreichung von Doxyzyklin an TetOn-Mäuse, die das Luziferasegen enthalten, wurde die Synthese von Luziferase ebenfalls sehr schnell induziert (Kistner et al., 1996). Innerhalb der ersten vier Stunden stieg die Luziferaseaktivität in manchen Organen um einige Zehnerpotenzen an. Das Maximum an Aktivität wurde nach 24 Stunden gemessen. In TetOff-Mäusen ist ein vergleichbares Regulationspotential möglich (Kistner et al., 1996).

Tetrazyklin bzw. Doxyzyklin als Induktoren des Tet-Systems werden nach oraler Gabe schnell resorbiert und diffundieren aufgrund ihrer Lipophilie leicht im

Körpergewebe (Forth et al., 1987). Dadurch gelangt das Antibiotikum sehr gut zum Wirkungsort, den Körperzellen. Außerdem wird das Antibiotikum nach oraler Verabreichung durch die Magensäure nicht inaktiviert. Langzeitstudien haben ergeben, daß nach 3-monatiger Verabreichung von 200 µg/ml Doxyzyklin keine toxischen Effekte oder histologischen Veränderungen beobachtet wurden (Kistner et al., 1996).

Ein weiterer Vorteil des Tet-Systems ist der mögliche Einsatz von gewebespezifischen Promotoren, unter deren Kontrolle der Transaktivator steht. Damit ist es möglich, transgene Tiere mit Tetrazyklin-induzierbarer gewebespezifischer Expression eines gewünschten Proteins herzustellen (Kistner et al., 1996). Dieser Punkt wird ausführlich in Kapitel 1.5.2 erläutert.

Nachteile und mögliche Probleme des Tet-Systems

Obwohl für eukaryotische Zellen Tetrazyklin und dessen Derivate in niedriger Dosierung, welche für die Genexpression ausreicht, nicht toxisch sind, ist die ständige Anwesenheit von Antibiotika in bestimmten Situationen nicht optimal. Beispiele hierfür sind bakteriologische Analysen, im Rahmen von Kreuzungen von transgenen Tieren oder in der Gentherapie (Gossen et al., 1995). Daher ist es wichtig, die Art des Tet-Systems je nach Zweck auszuwählen. Mögliche Probleme bei der Herstellung der Tet-gesteuerten Zelllinie oder der Tet-Mäuse sind ähnlich wie bei anderen Systemen: die Expression des Transaktivators könnte bei Integration des Regulatorplasmids in eine „silent site“ gehemmt werden. Oder die Expression des gewünschten Gens könnte zu hoch oder nicht regulierbar sein, weil die Integration des Antwortplasmids in der Nähe eines Enhancer bzw. endogenen Promotors erfolgte.

Ein ganz spezifisches Problem dieses Systems *in vitro* sind Reste von Tetrazyklin im fetalen Kälberserum, das häufig als Zusatz für Medien in der Zellkultur verwendet wird. Dies kann durch Verwendung eines speziellen Serums („Tet System Approved Fetal Bovine Serum“, von der Firma Clontech) leicht umgangen werden.

1.5.2 Transgene Mäuse mit Tetrazyklin-induzierbarer gewebespezifischer Expression

Zur Herstellung von transgenen Mäusen mit Tetrazyklin-induzierbarer gewebespezifischer Expression eines gewünschten Gens ist ein Austausch des CMV-Promotors im ursprünglichen Regulatorplasmid notwendig. An seiner Stelle kann ein beliebiger gewebespezifischer Promotor verwendet werden. Dieser sorgt für eine konstitutive gewebespezifische Expression des reversen Transaktivators. Nach erfolgreicher Keimbahntransformation jeweils eines der beiden genetischen Elemente des Tet-Systems (Regulator- und Antwortplasmid) in das Chromosom von Mäusen entstehen zwei verschiedene Linien. Eine Mauslinie trägt den

(reversen) Transaktivator unter Kontrolle eines gewebespezifischen Promotors, und die zweite Linie trägt ein gewünschtes Gen unter Kontrolle des tTA- bzw. rtTA-abhängigen Promotors. Nach Kreuzung dieser Linien entstehen unter anderem doppelt-transgene Mäuse mit dem kompletten Tet-System (Tet-Mäuse). In der Literatur wurde schon von verschiedenen Tet-Mäusen berichtet, sowohl TetOn als auch TetOff, mit gewebespezifischer Expression eines gewünschten Gens in folgenden Organen:

Leber (TetOff-System)

Der leberspezifische Promotor P_{LAP} führte zu einer sehr spezifischen Regulation in Hepatozyten (Kistner et al., 1996). Nach oraler Verabreichung von Doxyzyklin (2 mg/ml) wurde weniger als ein Molekül Luziferase pro Zelle nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde in Abwesenheit des Antibiotikums eine mehr als 10^5 -fache Aktivierung des Luziferasegens beobachtet.

Milz, Thymus (TetOn-System)

Die T-Zell-spezifische TetOn-Maus besitzt das regulatorische Element des humanen CD2-Promotors (Legname et al., 2000). Nach oraler Verabreichung von Doxyzyklin (2 mg/ml, 7 Tage) konnte eine signifikante Luziferaseaktivität in Milz und Thymus gemessen werden, nicht aber in Leber, Herz und Lunge.

Lunge (TetOn-System)

Der lungenspezifische CC10-Promotor induzierte nach Verabreichung von Doxyzyklin die Expression von Interleukin-11 im Respirationstrakt (Ray et al., 1997). Dies wurde *in utero*, in neugeborenen und in erwachsenen Tieren beobachtet.

Epithelzellen (TetOn-System)

TetOn-Mäuse mit der humanen Cytokeratin-18-Expressions-cassette führen laut Literatur zu einer epitheliumspezifischen Expression in der Trachea, in den oberen Bronchien und den submucosalen Drüsen (Ye et al., 2001). Allerdings wurde ebenso im Dickdarm, den Nieren und den Hoden eine mittelstarke bis starke Expression beobachtet (Chow et al., 2000). Dies läßt darauf schließen, daß der Promotor nicht epitheliumspezifisch arbeitet.

1.6 Fragestellung

Im Rahmen dieser Dissertation sollte (1) ein neues transgenes Mausmodell etabliert werden, mit dessen Hilfe die MV-induzierte Immunsuppression untersucht werden sollte, und (2) ein Modell der Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp im Baumwollrattenmodell etabliert werden, um den Einfluß einer MV-Infektion auf diese Reaktion analysieren zu können.

(1) Mausmodell

Es sollte ein neues konditionell induzierbares Mausmodell etabliert und charakterisiert werden. Als genetische Grundlage dieser neuen transgenen Maus wurde das Tetrazyklin-Expressionssystem gewählt (TetOn-System). In diesem Modell sollte die Expression der für die Immunsuppression verantwortlichen MV-Glykoproteine WTF-H und WTF-F gewebespezifisch und exogen regulierbar sein, um eine MV-Infektion und Reinfektion simulieren zu können. Es war beabsichtigt, mit diesem Modell die für die MV-induzierte Immunsuppression bedeutsamen Parameter in einem immunologisch und genetisch gut charakterisierten Organismus zu untersuchen.

Es war von besonderer Bedeutung, die durch Mikroinjektion hergestellten transgenen Mäuse mit F und H unter Kontrolle eines Transaktivator-abhängigen Promotors vollständig zu charakterisieren. Dies umfasst die Genotypisierung und den Nachweis des vollständig inserierten Fragments. Außerdem sollte die Organisation der integrierten DNA im Genom der Tiere untersucht werden (Anzahl und Anordnung der Kopien). Um die Charakterisierung der Mäuse zu ermöglichen, war die Etablierung einer Genotypisierungs-PCR und einer Southern-Blot-Methode im Labor notwendig. Nach Auskreuzung zu homozygoten Tieren sollten doppelt-transgene Tiere mit Tetrazyklin-induzierbarer Expression von F und H in T-Zellen hergestellt werden, wobei die Expression *in vitro* und *in vivo* untersucht werden sollte. Unter Verwendung dieses Modells sollten abschließend die Auswirkungen der Expression von F und H auf das Immunsystem analysiert werden. Dazu gehört unter anderem die Analyse der MV-spezifischen Immunantwort und MV-induzierten Immunsuppression, sowie Untersuchungen während einer Langzeit-F/H-Expression.

(2) Baumwollrattenmodell

Im Baumwollrattensystem sollte das in Mäusen aufgebaute kutane Hypersensitivitätsmodell mit DNFB etabliert werden, um den Einfluß einer MV-Infektion auf diese Reaktion analysieren zu können. Die CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen sollten charakterisiert werden, um die Funktion dieser Zellen während der DTH-Antwort analysieren zu können. In Baumwollratten wurde gezeigt, daß die primäre DNFB-spezifische T-Zellantwort durch MV unterdrückt wird (Niewiesk et al., 2000;

Avota et al., 2001). Diese Suppression der primären DNFB-Antwort sollte im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht werden; ebenso die sekundäre DNFB-Antwort. Abschließend war der Einfluß von MV auf die primäre und sekundäre DNFB-Reaktion zu untersuchen.

2. Material

2.1 Versuchstiere

2.1.1 Baumwollratten

Der verwendete Baumwollratten-Inzuchtstamm Cotton N/Ico wurde von der Firma Iffa Credo (Lyon, Frankreich) bezogen. Die Tiere wurden unter spezifiziert pathogenfreien (SPF) Bedingungen innerhalb eines Barriersystems, bei einer Raumtemperatur von 20 +/- 2°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50 +/- 5 %, gehalten. Sie wurden mit Wasser und Trockenfutter versorgt, der Licht-Dunkelrhythmus betrug 12 Stunden. Die Zuchtkolonie des Instituts wurde regelmäßig durch neue Zuchtpaare ergänzt. Jungtiere wurden im Alter von 6 Wochen von den Eltern abgesetzt und in Gruppen von maximal 5 Tieren gehalten. Männliche Baumwollratten wurden im Alter von 8 Wochen alleine gehalten, um Bißwunden zu vermeiden. Die Tiere sind sehr scheu und schreckhaft und wurden daher mit Hilfe einer Fangzange aus den Käfigen genommen (Niewiesk et al., 1997 c). Um den Stress der Tiere so gering wie möglich zu halten, wurden alle Manipulationen unter Ethernarkose durchgeführt. Anschließend wurden infizierte Baumwollratten in Isolatoren innerhalb des Barriersystems untergebracht, um eine Ansteckung der anderen Tiere zu vermeiden.

2.1.2 Mäuse

Der Maus-Inzuchtstamm C57BL/6 wurde von Harlan Winkelmann bezogen. Die transgenen Mäuse mit den Glykoproteine F und H von MV-Wildtyp WTF unter Kontrolle des Transaktivator-abhängigen Promotors (C57BL/6-TgN(M-HF/TRE)#1-4 vim) wurden von der Firma RCC (Schweiz) speziell für diese Arbeit hergestellt. Desweiteren wurden T-Zell-spezifische Induziermäuse von R. Zamoyska aus England bezogen (Legname et al., 2000). Sie besaßen den genetischen Hintergrund von (CBA x C57/BL10)F2-Mäusen, die zweimal mit C57BL/10-Mäusen rückgekreuzt waren. Die Tiere wurden unter SPF-Bedingungen innerhalb des Barriersystems der Baumwollratten gehalten. Sie wurden ebenfalls mit Wasser und Trockenfutter bei einem Licht-Dunkelrhythmus von 12 Stunden versorgt. Die verschiedenen Mausstämme und Linien wurden am Institut gezüchtet. Dabei wurden Jungtiere im Alter von 4-5 Wochen von den Eltern abgesetzt und die verschiedenen Geschlechter getrennt gehalten. Fast alle Manipulationen wurden

unter Ethernarkose durchgeführt. Infizierte Tiere wurden in Isolatoren innerhalb des Barriersystems untergebracht.

2.2 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien stammen aus Beständen des Instituts, mit Ausnahme der von Clontech bezogenen HeLa rtTA- und HeLa tTA-Zellen.

Zelllinie	Bemerkung
Verozellen	für MV permissive Fibroblastenzelllinie, aus Nierenzellen grüner Meereskatzen gewonnen
293-F	humane embryonale Nierenzelllinie mit stabiler Expression von Fusionsprotein von MV (Schlender et al., 1996)
YAC-1	murines Leukämievirus-induziertes Lymphom
HeLa rtTA HeLa tTA	HeLa-Zellen mit konstitutiver Expression von Transaktivator rtTA bzw. tTA des Tetrazyklin-Expressionssystems (Gossen and Bujard, 1992)

Tabelle 1: Zusammenstellung der verwendeten Zelllinien

2.3 Virusstämme

Virusstamm	Bemerkung	Herkunft
MV Edmonston	MV-Impfstamm	Virologie, Würzburg
MGV	rekombinantes MV, F und H von MV wurden durch G-Protein von VSV ersetzt	Spielhofer et al., 1998
FV-B	replikationsdefektes Virus, „spleen focus-forming virus“ (SFFV), Komponente des murinen Leukämievirus „Friend Virus“	Dittmer et al., 1998

Tabelle 2: Zusammenstellung der verwendeten Virusstämme

2.4 Plasmide

Plasmid	Bemerkung	Herkunft
pBI4_liFiH6	Derivat von pBI4/pBI (Bujard/Clontech), das 6,5 kb große Fragment mit F und H von MV-WTF unter Kontrolle eines Transaktivator-abhängigen bidirektionellen Promotors (Abbildung 4) wurde zur Herstellung transgener Mäuse verwendet (TetOn-System)	Andrew Davidson (Bristol)
pCG-WTF-HB1	enthält Hämagglutinin von MV-Wildtyp WTF, wurde zur Herstellung von 293-F/H-Zellen verwendet	Johnston et al., 1999

Tabelle 3: Zusammenstellung der verwendeten Plasmide

2.5 Oligonukleotide

Die Oligonukleotide wurden von der Firma Invitrogen bezogen.

Oligo-nukleotide	Bindungsort	DNA-Sequenz in 5'-3'-Richtung	PCR-Bedingungen und Größe
SV40-F1	SV40 PolyA	AAGGTCGCGCGCATTCCCGATGAA	1 min 94°C, 1 min 60°C, 1 min 30 s 72°C; 30 Zyklen; 1,1 kb
MV38.a	Fusionsprotein	GTCACAAGGGAACCTAATAGCCA	
MV13	Fusionsprotein	CTGTTGTGTAACACTTGCAAAGG	1 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 30 s 72°C; 30 Zyklen; 1,1 kb
MV38	Fusionsprotein	GGGGTGGTAGGAATAGGAAGTGCA	
MV39	Fusionsprotein	TCTGCAATCTCTACCCTCGTGCAG	1 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 30 s 72°C; 35 Zyklen; 1,4 kb
Pbi1	P _{bi}	TATATAGGCCTCCCACCGTA	
Pbi3	P _{bi}	GTCGAGTAGGCGTGTACGGT	1 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 30 s 72°C; 35 Zyklen; 1,16 kb
H21	Hämagglutinin	CCTTGACCTGATGCTCAATTGAG	
H29	Hämagglutinin	AGCCATCTACACCGCAGAGATCCA	1 min 94°C, 1 min 60°C, 2 min 10 s 72°C; 30 Zyklen; 1,93 kb
B-Globin1	β-globin PolyA	TTGCCCTCCCATATGTCCTTCCG	
H34	Hämagglutinin	TCTGGTGGACATATCACTCACTCT	1 min 94°C, 1 min 58°C, 2 min 72°C; 45 Zyklen; 1,04 kb
MV38.c	Fusionsprotein	CATCAAATCCTATGTAAGGTCGC	
H34	Hämagglutinin	TCTGGTGGACATATCACTCACTCT	1 min 94°C, 1 min 56°C, 2 min 72°C; 35 Zyklen; 1 kb
MV38.b	Fusionsprotein	CCAGGCCTAAAGCCTGATCTTACA	
H21	Hämagglutinin	CCTTGACCTGATGCTCAATTGAG	1 min 94°C, 1 min 58°C, 1 min 10 s 72°C; 30 Zyklen; 480 bp
Intron1	zw. P _{bi} und Intron1	GCGTTGATCCTGAGAACTTC	
MV39	Fusionsprotein	TCTGCAATCTCTACCCTCGTGCAG	1 min 94°C, 1 min 60°C, 1 min 10 s 72°C; 30 Zyklen; 330 bp
Intron2	zw. P _{bi} und Intron2	GACGGACCGATCCTGAGAACTTC	
3'-GAPDH	GAPDH	ACCACCATGGAGAAGGCTGG	1 min 94°C, 1 min 58°C, 30 s 72°C; 30 Zyklen; 530 bp
5'-GAPDH	GAPDH	CTCAGTGTAGCCCAGGATGC	
VA2-fwd	Transaktivator rtTA	ATAAAAAGCACTGTGGATTCTGC	1 min 94°C, 1 min 60°C, 30 s 72°C; 30 Zyklen; 270 bp
VA2-rvs	Transaktivator rtTA	AGAGGGGACAGGAAATCTCTAAGA	

Tabelle 4: Zusammenstellung der verwendeten Oligonukleotid-Kombinationen. Mit Ausnahme der Oligonukleotide 3'-GAPDH, 5'-GAPDH, VA2-fwd und VA2-rvs beziehen sich die Bindungsorte der Primer auf das Konstrukt, das zur Herstellung transgener Mäuse mit den MV-Glykoproteinen F und H verwendet wurde (Abbildung 4 in Kapitel 4.1.2).

Abkürzungen: PolyA: Polyadenylierungssignal; P_{bi}: bidirektioneller Promotor; zw.: zwischen; GAPDH: Glyceraldehyd-P-Dehydrogenase.

2.6 Antikörper und Antiseren

Antikörper	Bemerkung	Herkunft
CR-CD4	spezifisch für CD4 der Baumwollratte	Streif et al., 2004
CR-CD8	spezifisch für CD8 der Baumwollratte	Streif et al., 2004
L77	spezifisch für MV-Hämagglutinin	Liebert et al., 1990
W6/32	humaner MHC I-Antikörper	Barnstable et al., 1978
H-2Ld/H-2Db	monoklonaler Antikörper gegen MHC I der Maus	Pharmingen
Antiseren	Bemerkung	Herkunft
POD-Ziege-anti-Maus-IgG	Peroxidase-gekoppelt	Dianova
POD-Ziege-anti-Kaninchen	Peroxidase-gekoppelt	Dianova
FITC-Esel-anti-Maus-IgG	Fluoreszeinisothiocyanat-gekoppelt	Dianova
FITC-Ziege-anti-Maus-IgG	Fluoreszeinisothiocyanat-gekoppelt	Dianova
humanes anti-MV-Serum	enthält Antikörper gegen H, F und N von MV	Gesunder Spender

Tabelle 5: Zusammenstellung der verwendeten Antikörper und Antiseren

2.7 Radiochemikalien

Radioaktives Methyl-³H-Thymidin wurde von der Firma Amersham bezogen. Natrium-Chromat-Cr⁵¹ (Na₂⁵¹CrO₄) stammte von der Firma NEN-Life-Science.

2.8 Verbrauchsmaterial

Sämtliche für diese Arbeit verwendeten Chemikalien wurden von den Firmen BioRad, Böhringer, Gibco, Merck, Perkin Elmer, Pharmacia, Promega, R & D Systems, Roth, Serva und Sigma erworben. Steriles Einwegmaterial wurde von den Firmen Eppendorf, Falcon und Greiner bezogen. Die Firma Hartenstein lieferte Glaswaren und Operationsbesteck, Enzyme wurden von der Firma MBI Fermentas erworben. Es wurden verschiedene „Kits“ der Firmen Qiagen und Amersham Pharmacia Biotech verwendet. Weiterhin wurden Reaktionszusätze von den Firmen Amersham Biosciences, Gibco, Invitrogen und Roche Molecular Biochemicals geliefert.

2.9 Medien, Lösungen und Puffer

2.9.1 Zellkultur

Waschmedium:	PBS 0,1 % FKS (Gibco)
Einfriermedium:	90 % FKS 10 % DMSO (Merck)
10x PBS:	80,0 g NaCl 2,0 g KCl 11,5 g Na ₂ HPO ₄ × H ₂ O 2,0 g KH ₂ PO ₄ H ₂ O ad 1000 ml
ATV:	0,8 % (w/v) NaCl 0,04 % (w/v) KCl 0,1 % (w/v) D-Glukose 0,058 % (w/v) NaHCO ₃ 0,05 % (w/v) Trypsin 0,02 % (w/v) EDTA

Medium für Suspensionszellen

RPMI komplett:	RPMI 1640 (Gibco) 2 mM Glutamin 1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco) 1 % (v/v) Natrium-Pyruvat (Gibco) 100 I.E./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
----------------	--

Medium für adhärenente Zellen

MEM komplett:	MEM 100 I.E./ml Penicillin 100 µg/ml Streptomycin
---------------	---

Medium für Viruszucht

Medium für Verozellen:	DMEM 2 mM Glutamin 1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren
------------------------	--

1 % (v/v) Natrium-Pyruvat
100 I.E./ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
2 % FKS

2.9.2 Durchflußzytometrie

FACS-Puffer: PBS
1 % BSA (Sigma)
0,02 % NaN₃

Verdünnungspuffer
für Antikörper: PBS
10 % BSA
0,02 % NaN₃
10 % FKS (bzw. Baumwollrattenserum)

2.9.3 Proliferationstest

Antigen-
Beschichtungspuffer: 200 mM Na₂CO₃ in PBS
pH 9,6

Zellkulturmedium: RPMI 1640
2 mM Glutamin
1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren
1 % (v/v) Na-Pyruvat
100 I.E./ml Penicillin
100 µg/ml Streptomycin
2 % Baumwollrattenserum

MV-Antigen: 10 µg/ml UV-inaktiviertes Masernvirus in PBS

2.9.4 ICA-Färbung

Fixierungslösung: PBS
3,7 % Formaldehyd

Waschpuffer: PBS
0,1 % BSA
0,02 % NaN₃

Verdünnungslösung
für Antikörper:

PBS
0,1 % BSA
0,02 % NaN₃
10 % FKS

Substratlösung:

1/20 3-Amino-9-Ethyl-Carbazol (Sigma)
19/20 0,05 M Na-Acetat pH 5,0
0,5 µl 30 % H₂O₂/ml Substrat

2.9.5 Southern-Blot

Depurinationslösung:

0,2 M HCl

Denaturationslösung:

0,5 M NaOH
1,5 M NaCl

Neutralisationslösung:

1 M TrisHCl, pH 7,5
1,5 M NaCl

20x SSC:

3 M NaCl
0,3 M Na₃C₆H₅O₇

Hybridisierungspuffer:

Hybridisierungspuffer (Amersham Pharmacia
Biotech)
0,5 M NaCl
4 % Blockierungsreagens (Amersham Pharma-
cia Biotech)

primärer Waschpuffer:

2 M Urea
0,1 % SDS
50 mM Na-Phosphat, pH 7,0
150 mM NaCl
1 mM MgCl₂
0,2 % Blockierungsreagens

20x sekundärer
Waschpuffer:

1 M Tris base
2 M NaCl
pH 10,0

2.9.6 ELISA

Beschichtungspuffer:	200 mM Na-Carbonatpuffer, pH 9,6
Blockierungspuffer:	PBS 10 % FKS 0,05 % Tween 20 (Serva) pH 7,43
Verdünnungspuffer:	PBS 10 % FKS 0,05 % Tween 20 pH 7,43
Waschpuffer:	PBS 0,05 % Tween 20 pH 7,4
Substratpuffer:	35 mM Zitronensäure x H ₂ O 66 mM Na ₂ HPO ₄ x H ₂ O, pH 5,2
Substratlösung:	0,5 mg/ml o-Phenyldiamin in Substratpuffer 0,01 % H ₂ O ₂ (Sigma)
Stopplösung:	1 M H ₂ SO ₄

2.10 Geräte

Autoklaven, MM München
Brutschrank, Heraeus
Durchflußzytometer (FACScan), Becton & Dickinson
Eismaschine, Scotsman AF 10
Elektrophoreseapparatur inklusive Zubehör, institutseigene Werkstatt
ELISA Reader, Molecular Devices
Ethernarkose-Gefäß
Gammazähler, LKB
Harvester Automach 2000, Dynatech
Heizblock, Liebisch
Hybridisierungsöfen, Hybaid Mini Oven MK II
Laborwaage, Sartorius
Magnetrührer, GLW
Mikroskop, Leitz
Mikrowelle, Brother Powerwave

Multi-Pipette, Eppendorf
Netzgerät E554, Consort
PCR-Gerät, Peltier Thermal Cycler 200
pH-Meter, WTW
Pipetten, Gilson
Schüttler, Bühler
Spektralphotometer, Eppendorf
Sicherheitswerkbank, Gelaire, Flow Laboratories
Southern-Blot-Apparatur inklusive Zubehör, institutseigene Werkstatt
Szintillationszähler, Beckmann
UV-Detektor, Vilber Lourmat
Videoprint-Anlage, Mitsubishi Video Copy Processor
Vortexer, Cenco
Wasserbad, GFL
Zentrifugen: Tischzentrifuge 5417C, Eppendorf; Zellkulturzentrifuge Rotana/K,
Hettich; Großzentrifuge RC 5B, Sorvall (Rotor HB-4, GSA, GS-3)

3. Methoden

3.1 Zellkultur

3.1.1 Haltung von adhärenenten Zellen

Verozellen wurden in MEM komplett/5 % FKS kultiviert, zweimal pro Woche mit 10 ml 37°C warmem ATV vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und 1:5 verdünnt wieder in einer Flasche ausgesät.

293-F-Zellen wurden in MEM komplett/10 % FKS/500 µg Gentamycin/ml kultiviert und zweimal pro Woche mit 5 ml 1x PBS/1 mM EDTA vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst. Nach Aufnahme der Zellen in frischem Medium wurden die Zellen 1:4 verdünnt und in einer Flasche ausgesät.

HeLa rtTA-Zellen wurden in MEM komplett/10 % tet-FKS kultiviert und zweimal pro Woche mit 10 ml 37°C warmem ATV vom Boden der Zellkulturflasche abtrypsiniert, in frischem Medium resuspendiert und 1:10 verdünnt wieder in einer Flasche ausgesät. HeLa tTA-Zellen wurde zusätzlich 1 µg/ml Doxyzyklin zugegeben. Das Serum tet-FKS ist ein spezielles Serum für das Tetrazyklin-Expressionssystem („Tet System Approved Fetal Bovine Serum“, von der Firma Clontech).

3.1.2 Haltung von Suspensionszellen

YAC-1-Zellen wurden in 12-Loch-Platten mit RPMI komplett/10 % FKS kultiviert und zweimal pro Woche 1:4, 1:16 und 1:64 geteilt.

3.2 Molekularbiologische Methoden

3.2.1 Agarosegel-Elektrophorese

Eine Standardmethode zur Auftrennung von DNA-Molekülen verschiedener Größe ist die Elektrophorese durch ein Agarosegel. Eine effiziente Trennung erhält man, wenn die Konzentration der Agarose je nach DNA-Fragmentgröße variiert. Mit

einem 1 %-igen Agarosegel wird eine optimale Auftrennung für Moleküle von 1-10 kb erreicht.

Die entsprechende Menge Agarose wurde in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle aufgekocht. Nach Abkühlung auf 50°C wurde Ethidiumbromid (Endkonzentration 3 µg/ml) zugegeben und die gelöste Agarose zügig in eine horizontale Gelkammer gegossen. Sobald die Agarose erstarrt war, wurde sie mit 1x TAE-Puffer bedeckt.

DNA-Proben wurden vor dem Auftragen mit 10x Stop-Puffer (von MBI Fermentas bezogen) versetzt und in die Geltaschen gefüllt. Die Gelelektrophorese wurde bei maximal 200 V/200 mA durchgeführt. Die Agarosegele wurden anschließend unter UV-Licht analysiert und photographiert.

3.2.2 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (kurz: PCR, von „Polymerase Chain Reaction“) ist eine enzymatische Methode zur Amplifizierung von DNA-Fragmenten. Das Prinzip beruht auf einer zyklischen, automatisierten Wiederholung von dsDNA-Denaturierung, Hybridisierung der Oligonukleotide an die ssDNA und Elongation der Oligonukleotide. Für die Amplifikation von DNA-Fragmenten werden thermostabile DNA-Polymerasen verwendet.

PCR-Ansatz

- 10 µl PCR-Puffer (10x)
- 4 µl MgCl₂ (25 mM)
- 1 µl dNTP-Mix (20 mM)
- 1 µl Oligonukleotid I (100 ng/µl)
- 1 µl Oligonukleotid II (100 ng/µl)
- 100 ng Plasmid-DNA / 300 ng genomische DNA / 5 µl cDNA
- 2 U Taq-DNA-Polymerase
- ad 100 µl ddH₂O (steril)

Die entsprechenden Oligonukleotidpaare (Tabelle 4) wurden mit Hilfe von publizierten Gensequenzen entworfen und von Invitrogen bezogen. Der PCR-Puffer, MgCl₂ und die Polymerase stammten von MBI Fermentas, der dNTP-Mix von Amersham Biosciences. Der PCR-Ansatz wurde auf Eis zusammenpipettiert, gut vermischt und kurz abzentrifugiert. Die PCR selbst wurde im Thermocycler unter bestimmten Standardbedingungen durchgeführt, wobei die Temperatur für die Oligonukleotid-Hybridisierung von der Schmelztemperatur der Oligonukleotide abhängig war. Die Zeit für die Elongation richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments (1 min pro 1.000 bp).

Im allgemeinen wurde die PCR bei folgenden Bedingungen durchgeführt:

- 4 min 94°C
 - 1 min 94°C
 - 1 min 58°C
 - 1 min 72°C
 - 10 min 72°C
- } 30 Zyklen

Nach Beendigung der Reaktion wurden 10 µl des Ansatzes zur quantitativen und qualitativen Analyse auf ein Agarosegel aufgetragen und elektrophoretisch aufgetrennt.

3.2.3 Fällern von DNA

Fällern von PCR-DNA

Um DNA zu fällen, wurden 1/10 Volumina 3 M NaAc pH 5,3 und 100 %-iger EtOH (-20°C) mit einer Endkonzentration von 70 % zu dem Ansatz gegeben, der die PCR enthielt. Nach kurzem Mischen wurde die DNA 1 h bei -70°C gefällt und anschließend 30 min (14.000 rpm, +4°C) zentrifugiert. Um noch vorhandene Salzreste zu entfernen, wurde die DNA mit 1 ml 70 %-igem EtOH (-20°C) gewaschen und erneut 1 h bei -70°C gefällt. Nach einer 30-minütigen Zentrifugation bei 14.000 rpm und +4°C wurde das DNA-Pellet in ddH₂O aufgenommen und bis zur weiteren Verwendung auf -20°C gelagert.

Fällern von genomischer DNA

Man präzipitierte genomische DNA mit 1/20 Volumina 5 M NaCl und 2,5 Volumina 100 %-igem EtOH. Die Lösung wurde gemischt und 30 min (14.000 rpm, RT) zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde in TE-Puffer pH 8,0 aufgenommen und bei 37°C bis zum vollständigen Lösen der DNA inkubiert.

3.2.4 Spaltung von DNA mit Hilfe von Restriktionsendonukleasen

Restriktionsendonukleasen sind Enzyme prokaryotischer Herkunft, die spezifische Nukleotidfolgen innerhalb der doppelsträngigen DNA erkennen und spalten. Dies geschieht durch Aufbrechen von je einer Phosphodiesterbindung in jedem der beiden Stränge. Jedes Restriktionsenzym weist ein Optimum an Aktivität bezüglich Salzbedingungen und Temperatur auf. Die entsprechenden Pufferbedingungen sind von den Herstellern angegeben.

Restriktionsspaltung von Plasmid-DNA

Zur Herstellung eines linearisierten Kopienstandards für Southern-Blots wurde Plasmid-DNA gespalten. Die entsprechende Plasmidmasse, die jeweils eine Kopie, 5, 10 oder 15 Kopien eines bestimmten Gens enthielt, wurde mit 1 U Enzym gespalten. Die Reaktionen wurden in einem 20 µl-Ansatz durchgeführt. Dieser enthielt die entsprechende Kopieanzahl des Gens, 2 µl 10x Puffer, 1 U Enzym und wurde mit ddH₂O auf 20 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Der Verdau wurde 1 h bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur inkubiert und anschließend als Kopienstandard bei Southern-Blots eingesetzt.

Restriktionsspaltung von hochmolekularer DNA

Genomische DNA wurde mit 20 Units Enzym pro µg DNA gespalten. Dabei mußte ein entsprechend größerer Ansatz gewählt werden, da die im Enzym enthaltene Glycerinmenge 5 % des Gesamtansatzes nicht überschreiten durfte. Die Reaktionen wurden meist in einem Gesamtvolumen von 100 µl durchgeführt. Diese Ansätze enthielten 5-6 µg genomische DNA, 10 µl 10x Puffer, die entsprechende Enzymmenge und wurden mit ddH₂O auf 100 µl Gesamtvolumen aufgefüllt. Die Reaktionsansätze wurden bei der vom Hersteller empfohlenen Temperatur über Nacht inkubiert und anschließend präzipitiert.

3.2.5 Isolierung und Reinigung der DNA für die Mikroinjektion

Die DNA für die Mikroinjektion wurde mit Restriktionsenzymen geschnitten und mit Hilfe eines TAE-Agarosegels elektrophoretisch aufgetrennt. Danach wurde das spezifische Fragment mit Hilfe des „QIAEXII Kit“ gemäß den Angaben des Herstellers (Qiagen) aus dem Gel isoliert. Die DNA wurde präzipitiert, in Injektionspuffer (10 mM Tris-HCl, pH 7,4; 0,2 mM EDTA) aufgenommen und durch eine Elutip-D Mini-Säule (Schleicher and Schuell) gefiltert. Diese gereinigte DNA wurde für die Mikroinjektion eingesetzt.

3.2.6 Präparation genomischer DNA aus Mäuseohren

Die Präparation von genomischer DNA aus Tiergewebe wurde mit Hilfe des „DNeasy Tissue Kit“ von Qiagen durchgeführt. Für diesen Zweck wurde ein ca. 0,6 x 0,3 cm² großes Stück Hautlappen vom Ohr einer narkotisierten Maus abgeschnitten und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Nach Zugabe von 180 µl ATL-Puffer und 20 µl Proteinase K wurde der Verdau gemischt und bei +55°C über Nacht inkubiert. Die Suspension wurde erneut gemischt und 15 min

(14.000 rpm, RT) abzentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt und mit 200 µl AI-Puffer versetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation bei +70°C wurden 200 µl EtOH (96 - 100 %) zugegeben und das Reaktionsgefäß geschüttelt, bis eine homogene Lösung entstand. Die komplette Lösung wurde auf eine DNeasy-Säule gegeben und für 1 min (8.000 rpm, RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Säule mit 500 µl AW1-Puffer gewaschen bzw. zentrifugiert (1 min, 8.000 rpm, RT), anschließend erfolgte ein weiterer Waschschrift mit 500 µl AW2-Puffer (3 min, 14.000 rpm, RT). Der Durchfluß wurde verworfen und die Säule erneut 1 min (14.000 rpm, RT) zentrifugiert.

Für die DNA-Eluierung wurde die Säule auf ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben. Um eine optimale DNA-Konzentration zu erhalten, wurde die DNA in zwei aufeinanderfolgenden Schritten mit jeweils 100 µl AE-Puffer eluiert. Dabei wurde der Puffer auf die Membran gegeben und vor der Zentrifugation (1 min, 8.000 rpm, RT) jeweils 1 min bei RT vorinkubiert. Die genomische DNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei +4°C gelagert.

3.2.7 Arbeiten mit RNA

Beim Arbeiten mit RNA wurden nur RNase-freie Lösungen und Gefäße benutzt. RNase-freies DEPC-H₂O wurde folgendermaßen hergestellt:

ddH₂O wurde mit 0,01 % Diethylpyrocarbonat (DEPC) versetzt und kräftig geschüttelt. Das Gemisch wurde mindestens 12 h bei 37°C inkubiert und danach autoklaviert.

RNA-Aufreinigung

Die RNA-Aufreinigung erfolgte mit Hilfe des „RNeasy RNA-Extraktion-Kit“ von Qiagen. Je 10⁷ Zellen wurden 10 min (5.000 rpm, RT) zentrifugiert und das Pellet in 350 µl Lysepuffer aufgenommen. Nach erneuter Zentrifugation (30 min, 14.000 rpm, +4°C) wurde der Überstand in ein neues Eppendorfreaktionsgefäß überführt, mit 350 µl 70 %-igem Ethanol versetzt und auf eine Qiagen-Säule aufgetragen. Die Säule wurde für 15 s (10.000 rpm, RT) zentrifugiert und anschließend mit 700 µl Waschpuffer RW1 gewaschen (15 s, 10.000 rpm, RT). Danach folgte ein weiterer Waschschrift mit 500 µl Waschpuffer RPE. Für die RNA-Eluierung wurde die Säule auf ein neues Eppendorfreaktionsgefäß gegeben und die RNA mit 36 µl RNase-freiem H₂O eluiert (1 min, 10.000 rpm, RT).

Reverse Transkription von mRNA in cDNA

Die Reaktionszusätze wurden von Gibco bzw. Amersham Biosciences bezogen. 12 µl RNA-Lösung wurden mit 1 µl Oligo-dT-Primer (25 µM) gemischt und 10 min bei 70°C inkubiert. Anschließend wurde der Ansatz auf Eis gestellt und folgende Komponenten hinzugefügt: 4 µl 5x Puffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl dNTP-Mix (40 mM). Nach 2 min Inkubation bei 37°C wurden 200 U reverse Transkriptase Superscript II hinzugefügt. Zuletzt erfolgte eine einstündige Inkubation bei 37°C. Die cDNA wurde bis zur weiteren Verwendung bei -20°C aufbewahrt.

3.3 Southern-Blot

Für die enzymatische Markierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase, die Hybridisierung, das Waschen der Nylonmembran und die chemilumineszente Signalentwicklung wurde der „AlkPhos Direct Kit“ von Amersham Pharmacia Biotech verwendet.

Präparation der Sonden-DNA

Die Sonden-DNA wurde mit Hilfe einer PCR hergestellt. Anschließend wurde diese DNA mit 3 M NaAc pH 5,3 und 100 %-igem EtOH (-20°C) gefällt und mit 70 %-igem EtOH (-20°C) gewaschen. Zur Einstellung der DNA-Konzentration wurde ein DNA-Aliquot neben einem 1 kb-Marker auf ein 1 %-iges Agarosegel aufgetragen und daraufhin die DNA-Konzentration mit ddH₂O auf 10 ng/µl eingestellt.

Enzymatische Markierung von DNA-Fragmenten mit alkalischer Phosphatase:

Reaktionsansatz:

150 ng Sonden-DNA
15 µl Reaktionspuffer
3 µl Markierungsreagens
15 µl „cross-linker working solution“

Vor dem Zusammenpipettieren des Ansatzes mußte die zu markierende DNA in einem Eppendorfreaktionsgefäß für 5 min bei 100°C denaturiert und anschließend sofort für 5 min auf Eis gestellt werden. Erst dann wurden die restlichen Komponenten hinzugefügt. Die „cross-linker working solution“ bestand aus 5 µl „cross-linker“ Lösung, gemischt mit 20 µl ddH₂O. Der fertige Reaktionsansatz wurde 30 min bei 37°C inkubiert, auf Eis gestellt und innerhalb der nächsten 2 h für die Hybridisierung verwendet.

Transfer von gespaltener genomischer DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran über Vakuum

Die zu analysierende genomische DNA wurde mit einem gängigen Enzym gespalten und mit 5 M NaCl und 100 %-igem EtOH präzipitiert. Anschließend wurde diese DNA 5 min bei 65°C inkubiert und mit einem 1 %-igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Das Gel wurde unter UV-Licht photographiert; zur Bestimmung der Bandengrößen wurde ein Fluoreszenzlineal parallel zum Marker aufgelegt.

Um die DNA aus einem Agarosegel auf eine Nylonmembran („Hybond-N+“ von Amersham Pharmacia Biotech) zu transferieren, wurde das Gel zur Depurination 20 min in 250 ml 0,2 M HCl geschwenkt. Anschließend erfolgten 20 min Denaturation in 250 ml 0,5 M NaOH/1,5 M NaCl und 20 min Neutralisation in 250 ml 1 M TrisHCl pH 7,5/1,5 M NaCl. Währenddessen wurde die Transferplatte der Vakuumkammer 5 min in ddH₂O befeuchtet und die Nylonmembran 5 min in 10x SSC äquilibriert. Zum DNA-Transfer wurde die Nylonmembran blasenfrei auf die Transferplatte gelegt. Eine Gummimaske wurde auf der Membran so positioniert, daß nur die Ränder der Nylonmembran und die restliche Transferplatte bedeckt waren. Abschließend wurde das Gel auf die Nylonmembran gelegt, wobei die Ränder des Gels mit der Gummimaske überlappen mussten. Die Vakuumkammer wurde fest verschlossen und mit 1 l 10x SSC befüllt. Der DNA-Transfer dauerte 2 h bei 0,2 bar.

Beim Auflösen der Blot-Apperatur wurde die Oberseite der Membran mit einem Bleistift markiert. Die Nylonmembran wurde 10 s in 0,2x SSC geschwenkt und danach auf einem Whatman-Papier 30 min bei RT getrocknet. Mit Hilfe von UV-Stahlung (120 mJ) wurde die DNA über Quervernetzung an die Nylonmembran gebunden.

Vorhybridisierung und Hybridisierung

Man erwärmte den „AlkPhos Direct“ Hybridisierungspuffer in einer Rollerflasche im Hybridisierungssofen auf die Hybridisierungstemperatur, welche stringenzabhängig zwischen 50 und 75°C lag. Die Nylonmembran wurde vorsichtig in die Rollerflasche gegeben und für 40 min im Hybridisierungssofen bei der Hybridisierungstemperatur vorhybridisiert. Nach Zugabe der markierten DNA-Sonde wurde über Nacht hybridisiert.

Das Volumen des Hybridisierungspuffers richtete sich nach der Größe der Nylonmembran, in der Regel wurden 0,25 ml/cm² eingesetzt. Es wurden 5-10 ng markierte DNA-Sonde pro ml Puffer verwendet.

Waschen der Nylonmembran

Der primäre Waschpuffer wurde auf die Hybridisierungstemperatur erhitzt. Der Hybridisierungspuffer wurde abgossen und durch den primären Waschpuffer ersetzt. Nach 10 min Inkubation bei der entsprechenden Hybridisierungstemperatur wurde der Puffer durch frischen primären Hybridisierungspuffer ausgetauscht und erneut 10 min im Hybridisierungsofen inkubiert. Das Volumen des primären Waschpuffers war von der Größe der Nylonmembran abhängig. Es wurden 2-5 ml/cm² eingesetzt.

Anschließend folgten zwei weitere Waschschrte mit einem Überschuß an sekundärem Waschpuffer mit einer Inkubation von 5 min bei RT.

Chemilumineszente Signalentwicklung

Die Nylonmembran wurde auf eine Glasplatte gelegt und das Detektionsreagens „CDP-Star“ in einem Volumen von 30-40 µl/cm² auf die Oberseite der Membran pipettiert. Nach 5 min Inkubation bei RT wurde das überschüssige Detektionsreagens durch vorsichtiges Anheben der Glasplatte entfernt. Anschließend umwickelte man die Nylonmembran mit einer Haushaltsfolie und legte sie zusammen mit einem Röntgenfilm in eine lichtundurchlässige Kassette. Nach 20-60 min Inkubation wurde der Röntgenfilm entwickelt.

3.4 Transfektion

3.4.1 Stabile Transfektion mit FuGENE 6

Das Transfektionsreagens FuGENE 6 wurde von Roche Molecular Biochemicals bezogen. 24 h vor der Transfektion wurden je 2x10⁵ adhärenzte Zielzellen in 35 mm-Schalen ausgesät (4 Ansätze pro Zelllinie). Für diesen Zweck wurden HeLa tTA- bzw. HeLa rtTA-Zellen verwendet. Das zu transfizierende Plasmid und ein Selektionsplasmid wurden linearisiert und auf eine Konzentration von 0,02-2,0 µg/µl eingestellt. Folgende Plasmidverhältnisse von zu transfizierendem Plasmid zu Selektionsplasmid wurden steril vorbereitet: 20:1, 60:1 und 180:1 bei einer Gesamt-DNA von 2 µg pro Ansatz. Anschließend wurde der FuGENE 6-DNA-Komplex steril angesetzt. Drei Ansätze pro Zelllinie mit je 94 µl Serum-freiem Medium wurden mit 6 µl FuGENE 6 gemischt und zu den vorbereiteten Plasmidgemischen gegeben. Nach 15 min Inkubation bei RT wurde der FuGENE 6-DNA-Komplex vorsichtig auf die Zielzellen getropft. Die Zellen wurden in den Brutschrank gestellt, 24 h später in Selektionsmedium aufgenommen und verdünnt wieder ausgesät.

In den nächsten Wochen wurden die Zellen nur bei vollständiger Konfluenz verdünnt. 2-4 Wochen nach der Transfektion entstanden resistente Klone, die bei geeigneter Größe steril isoliert wurden und auf 6-Loch-Platten übertragen wurden. Diese Klone konnten auf die gewünschte Genexpression überprüft werden.

3.4.2 Transiente Transfektion mit Lipofektin zur Herstellung von 293-F/H-Zellen

Pro Transfektionsansatz wurden 250 µl OPTI MEM1 und 10 µl Lipofektin (von Invitrogen bezogen) in einem Polystyrenröhrchen zusammen gegeben und die Suspension für 45 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden 250 µl OPTI MEM1 mit 5 µg pCG-WTFH-B₁ gemischt und zu dem Lipofektin-OPTI MEM1-Gemisch gegeben. Nach einer 15-minütigen Inkubation bei RT und einem erneuten Mischen der Suspension erfolgte eine weitere 15-minütige Inkubation bei RT. Inzwischen wurden die zu transfizierenden 293-F-Zellen gezählt, 5x10⁶ Zellen mit 1 ml OPTI MEM1 gewaschen und in 500 µl OPTI MEM1 aufgenommen. Die 293-F-Zellen wurden in ein Napf einer 6-Loch-Platte gegeben und gleichmäßig verteilt. Nach vorsichtiger Zugabe des Lipofektin-DNA-Komplexes auf die Zellen wurde die Platte geschwenkt und 4 Stunden im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem Gummischaber abgelöst und für 10 min (1.000 rpm, +15°C) zentrifugiert. Das Pellet wurde in 4 ml DMEM/10 % FKS aufgenommen und auf zwei Näpfe einer 12-Loch-Platte verteilt. Über Nacht wurden die transfizierten Zellen im Brutschrank aufbewahrt. Am nächsten Morgen bereitete man die nun bereits fusionierenden Zellen für die weitere Verwendung vor.

Vorbereitung der transfizierten Zellen zur Injektion:

Die fusionierenden Zellen wurden mit einem Gummischaber abgelöst, je 10⁷ Zellen in 1 ml sterilem 1x PBS aufgenommen und den Baumwollratten i. p. injiziert.

3.5 Chromfreisetzungstest

Für den Chromfreisetzungstest wurden YAC-1-Zellen eingesetzt. Diese Zellen sind gute Zielzellen für natürliche Killerzellen, da YAC-1-Zellen von einem murinem Leukämievirus-induzierten Lymphom abstammen und eine niedrige MHC I-Expression aufweisen.

YAC-1-Zellen wurden mit 3,7 mBq Na₂⁵¹CrO₄ pro 10⁶ Zellen im Wasserbad für 80 min inkubiert. Danach wurden die Zellen zweimal gewaschen, um das nicht eingebaute Chrom zu entfernen. Effektorzellen (Milzzellen) wurden in variablen

Konzentrationen mit den radioaktivmarkierten Zielzellen (5×10^3 pro Napf) gemischt und in einem Gesamtvolumen von 150 μl RPMI komplett/10 % FKS pro Napf in einer 96-Mikrotiterplatte mit Rundboden ausplattiert. Die Platte wurde 2 min (800 rpm, 20°C) zentrifugiert und anschließend für 5 h im Brutschrank inkubiert. Von jedem Ansatz wurden Doppelbestimmungen durchgeführt. Zur Bestimmung der Spontanfreisetzung von Chrom wurden in 4 Näpfen 5×10^3 Zielzellen nur mit Medium bzw. zur Bestimmung der Totallyse mit Triton X 100 (Endkonzentration 3,3 %) inkubiert.

Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde die Platte 5 min (2.000 rpm, 20°C) zentrifugiert. Danach wurden pro Napf 75 μl Überstand entnommen und in Szintillationsröhrchen überführt. Die Radioaktivität im Überstand wurde im Gammazähler gemessen. Zur Berechnung der Zellyse wurde folgende Formel benutzt:

$$\frac{a-b}{c-b} \cdot 100 = \text{Lyse} [\%],$$

wobei a die Impulsrate (Zerfälle pro min) des Überstandes der mit Lymphozyten inkubierten Zielzellen, b die spontane Freisetzung der Zielzellen und c die maximal verfügbare Aktivität im Überstand nach Behandlung der Zielzellen mit Triton X 100 bezeichnet.

3.6 Immunologische Methoden

3.6.1 Durchflußzytometrie

Zellen verschiedener lymphoider Organe von Baumwollratten (Milz, Thymus, Lymphknoten) und Mäusen (Milz, Thymus) wurden mit der Durchflußzytometrie analysiert. Die Zellen der entsprechenden Organe wurden vereinzelt, gewaschen und gezählt (Kapitel 3.8.4). Die Zelldichte wurde mit Waschpuffer auf 1×10^6 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden in Durchflußzytometrierröhrchen überführt und 5 min (1.800 rpm, 4°C) abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen auf Eis gestellt. Es folgte die erste Färbung mit jeweils 100 μl Primärantikörper (12 $\mu\text{g}/\text{ml}$). Als Negativkontrolle für die Analyse dienten Zellen ohne Antikörper. Die Zellen wurden 1 h bei 4°C inkubiert und danach mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 1.800 rpm, 4°C), um nicht-gebundene Antikörperreste zu entfernen. Nun wurden jeweils 100 μl Fluoreszeinisothiocyanat- oder Phycoerythrin-gekoppelter Sekundärantikörper (10 $\mu\text{g}/\text{ml}$) zugegeben und erneut 1 h bei 4°C inkubiert. Dieses Antiserum wurde zuvor je nach Verwendungszweck in FACS-Puffer/10 % Baumwollrattenserum für 30 min bei 4°C vorinkubiert, um alle kreuzreagierenden Bindungsstellen abzusättigen. Somit

wurde verhindert, daß das gegen Maus-Immunglobuline gerichtete Antiserum mit Baumwollratten-Immunglobulinen auf der Oberfläche von B-Zellen kreuzreagiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen und die Zellen für die Analyse in 500 µl FACS-Puffer aufgenommen. Die Messung erfolgte am Durchflußzytometer von Becton Dickinson und wurde mit dem Programm „Cellquest“ ausgewertet.

3.6.2 Proliferationstest

Allgemeiner und MV-spezifischer Proliferationstest

Das Prinzip des Proliferationstestes beruht darauf, die Stoffwechselaktivität von T-Zellen durch den Einbau von radioaktivmarkiertem Thymidin in neusynthetisierte DNA zu messen. Für diesen Zweck wurden Milzzellen von Versuchstieren präpariert (Kapitel 3.8.4) und ausplattiert. Je nach Versuchsaufbau wurden die Zellen zusammen mit MV-Antigen ausplattiert (allgemeiner Proliferationstest, Maus) oder das MV-Antigen wurde zuvor über Nacht auf den Boden der Zellkulturplatte geschichtet (MV-spezifischer Proliferationstest, Baumwollratte/Maus). Da UV-inaktivierte Antigene verwendet und die Antigene somit über MHC II-Moleküle präsentiert wurden, konnte mit diesem Test die Proliferation von CD4⁺ T-Zellen gemessen werden.

Für die Messung der *ex vivo* Proliferation wurden 5x10⁵ Milzzellen in einem Gesamtvolumen von 200 µl pro Napf in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen und Flachboden ausplattiert. Je nach Verwendungszweck wurden die Zellen mit 5 µg/ml MV-Antigen ausplattiert, oder es wurde eine mit MV-Antigen beschichtete Platte verwendet. Dafür wurde das Antigen (MV oder MGv) in einer Konzentration von 10 µg/ml Beschichtungspuffer in einem Volumen von 50 µl/Vertiefung auf den Flachboden der Zellkulturplatte geschichtet und über Nacht bei 4°C inkubiert. Vor dem Ausplattieren der Zellen wurde die Platte zweimal mit Waschpuffer gewaschen, um die Reste des basischen Puffers zu entfernen. Als Kontrolle dienten Zellen mit Concanalin A (2,5 µg/ml) und Zellen ohne weitere Antigenstimulation. Pro Ansatz wurden Dreifachbestimmungen ausgeführt.

Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden 0,5 µCi Methyl-³H-Thymidin (³HdT) in einem Volumen von 25 µl/Napf zugegeben. 16-20 h später wurden die Zellen geerntet, indem der Inhalt der Nöpfe mit einem „Cell Harvester“ auf einen Glasfaserfilter gesaugt wurde. Dabei verblieben die Zellen und das in die DNA eingebaute ³HdT im Filter, die freie Radioaktivität wurde weggewaschen. Anschließend wurde die Filtermatte, zusammen mit 10 ml Szintillationsflüssigkeit, in eine Plastikfolie eingeschweißt. Am β-Szintillationszähler wurde der Einbau von radioaktiv markiertem Thymidin in die DNA in Zerfällen pro Minute („counts per minute“, c. p. m.) gemessen, als Maß für die Proliferation der Zellen.

Der Parameter für die Stimulation von CD4⁺ T-Zellen ist der Stimulationsindex (SI). Dieser wird berechnet, indem man die Proliferation der Zellen, die in Gegenwart von Antigen oder ConA gewachsen sind, durch die Proliferation der Mediumkontrolle teilt. Ein SI von $<$ oder $= 2$ zeigt eine unspezifische Stimulation an, ein SI von 2-4 bedeutet eine schwache T-Zellproliferation und ein SI von > 4 wird als starke T-Zellstimulation gewertet.

Kontaktinhibitionstest

Mit dem Kontaktinhibitionstest wird die Hemmung der T-Zellproliferation analysiert, die durch Kontakt mit Zellen induziert werden kann, die MV-Glykoproteine exprimieren. Dieser Test entspricht, mit einigen Abwandlungen, dem Proliferationstest.

Zu diesem Zweck wurden je 5×10^4 MV-Glykoproteine-exprimierende Zellen in einem Gesamtvolumen von 100 μ l pro Napf in einer Zellkulturplatte mit 96 Vertiefungen und Flachboden ausplattiert. Nach 2 h Inkubation im Brutschrank wurden die Zellen durch UV-Strahlung mit Hilfe einer UV-Handlampe (10 min, 254 nm) inaktiviert. Damit sollte ein Einbau des später zugegebenen radioaktiv markierten Thymidins in diese Zellen verhindert werden. Nun wurden je 5×10^5 Baumwollrattenmilzzellen mit und ohne Conavalin A (2,5 bzw. 5 μ g/ml) in einem Gesamtvolumen von 50 μ l pro Napf zugegeben. Pro Ansatz wurden Dreifachbestimmungen ausgeführt. Nach 48 h Inkubation im Brutschrank wurden 0,5 μ Ci ³HdT in einem Volumen von 25 μ l/Napf zugegeben. Anschließend wurde wie beim allgemeinen und MV-spezifischen Proliferationstest vorgegangen.

3.6.3 ELISA

Mit Hilfe der ELISA-Technik (enzyme linked immunosorbent assay) können Antikörper und deren Konzentrationen über die Aktivitätsbestimmung eines Markerenzym ermittelt werden. Im ersten Reaktionsschritt bindet der nachzuweisende Antikörper an ein Festphasen-gebundenes Antigen. Dieser gebundene Antikörper wird im zweiten Reaktionsschritt durch Enzym-markierte Anti-Spezies-Antikörper nachgewiesen.

Eine weitere Anwendung dieser Methode ist der Nachweis von Antigenen. In diesem Fall werden zwei Antikörper eingesetzt, die unterschiedliche Epitope eines multivalenten Antigens erkennen. Zuerst wird ein Erstantikörper an die Festphase gebunden, welcher das nachzuweisende Antigen bindet. Das immobilisierte Antigen wird durch einen biotinylierten Zweitantikörper markiert. Im nächsten Reaktionsschritt bindet Enzym-markiertes Streptavidin an den Zweitantikörper, wodurch das nachzuweisende Antigen ermittelt wird.

Nachweis von MV-spezifischen Antikörpern der Maus

Zum Nachweis MV-spezifischer Antikörper im Mausmodell wurde eine 96-Loch-Platte mit Rundboden mit 100 µl gereinigtem UV-inaktiviertem MV-Antigen (5 µg/ml) pro Napf über Nacht bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte dreimal mit Waschpuffer gewaschen. Zur Absättigung von unspezifischen Bindungsstellen wurden 100 µl Blockierungspuffer pro Napf zugegeben und 20 min bei RT inkubiert. Nun erfolgte eine 10-minütige Inkubation bei 4°C. Danach wurde der Puffer abgekippt und die Platte abgeklopft, um Reste des Blockierungspuffers zu entfernen. Die zu testenden Seren wurden 1:50 mit Verdünnungspuffer gemischt und auf Eis gelagert. Die Platte wurde nun ebenfalls auf Eis gelagert und pro Napf 100 µl der Serumverdünnungen hinzugefügt. Dabei wurden die Proben jeweils im Doppelansatz bestimmt.

Nach 1 h Inkubation bei 4°C wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und in jeden Napf 100 µl Peroxidase-gekoppelten Ziege-anti-Maus-IgG Antikörper (1:500 in PBS/10 % FKS) zugegeben. Die Platte wurde 1 h bei RT inkubiert und erneut fünfmal mit Waschpuffer gewaschen. Anschließend wurde die Substratlösung in einem Volumen von 100 µl hinzugefügt und die Platte bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach 10-15 min wurde die Farbreaktion mit je 50 µl konzentrierter Schwefelsäure pro Napf abgestoppt. Die optische Dichte wurde im ELISA-Reader bei einer Absorption von 492 nm und einer Referenz bei 405 nm gemessen. Als Negativkontrolle diente ein natives Mausserum, als Positivkontrolle wurde der Antikörper L77 (10 µg/ml) in einem Gesamtvolumen von 100 µl eingesetzt.

Nachweis von MV-spezifischen Antikörpern der Baumwollratte

Der Nachweis von MV-spezifischen Antikörpern der Baumwollratte weicht in folgenden Punkten vom Nachweis von MV-spezifischen Antikörpern der Maus ab:

- Die 96-Loch-Platte wurde mit 10 µg/ml MV-Antigen über Nacht bei 4°C beschichtet. Am nächsten Tag wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen.
- Die zu testenden Seren wurden 1:100 mit Verdünnungspuffer gemischt und auf Eis gelagert.
- Als Zweitantikörper wurde ein polyklonaler Kaninchen-anti-Baumwollratten-IgG Antikörper (1:3000 in PBS/10 % FKS) verwendet. Nach 1 h Inkubation bei RT wurde die Platte fünfmal mit Waschpuffer gewaschen und ein zusätzlicher Antikörper eingesetzt.
- Als zusätzlicher Drittantikörper diente Peroxidase-konjugierter Ziege-anti-Kaninchen Antikörper (1:3000 in PBS/10 % Baumwollrattenserum). Diese Antikörperverdünnung wurde vor der Verwendung für 20 min lichtgeschützt auf Eis vorinkubiert, um kreuzreagierende Antikörper zu adsorbieren. Nach fünfmaligem Waschen wurde die Substratlösung zugegeben.

Als Negativkontrolle diente ein natives Baumwollrattenserum, als Positivkontrolle wurde ein Baumwollrattenserum mit bekanntem MV-spezifischem Antikörper-Titer eingesetzt.

3.6.4 Neutralisationstest

Die virusneutralisierende Eigenschaft von Antikörpern oder Seren wurde mit Hilfe des Neutralisationstests charakterisiert. Mit diesem Testsystem wird die biologische Eigenschaft untersucht, die Infektion permissiver Zellen mit infektiösen Viruspartikeln *in vitro* zu inhibieren.

Zum Nachweis MV-neutralisierender Antikörper wurde ein Neutralisationstest in einer 96-Flachboden-Mikrotiterplatte durchgeführt. Von den zu testenden Seren wurden Verdünnungsreihen in Zweierschritten mit MEM ohne FKS hergestellt. Diese Verdünnungsreihen wurden in Doppelbestimmungen mit je 50 µl pro Napf auf die Zellkulturplatte verteilt. Anschließend wurden 50 TCID₅₀ MV (1 TCID₅₀ ist diejenige Infektionsdosis, die ausreicht, um 50 % einer Gewebekultur zu infizieren) in einem Gesamtvolumen von 50 µl MEM ohne FKS pro Napf zugegeben. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurden 1x10⁴ Verozellen in 100 µl MEM komplett/10 % FKS in jeden Napf pipettiert. Die Platten wurden im Brutschrank aufbewahrt. Nach 4-5 Tagen wurde der MV-spezifische zytopathische Effekt lichtmikroskopisch untersucht. Die Serumverdünnung, bei der in Doppelbestimmungen das MV gerade noch neutralisiert wurde, d. h. kein zytopathischer Effekt nachweisbar war, entsprach dem Titer neutralisierender Antikörper. Als Negativkontrolle diente ein natives Baumwollrattenserum, als Positivkontrolle wurde ein MV-spezifisches Baumwollrattenserum mit bekanntem Neutralisationstiter eingesetzt.

3.6.5 Färbung von Zellen nach Pappenheim

Die zu färbenden Zellen wurden mittels Cytospin abzentrifugiert. Dafür wurden 2x10⁵ Zellen in einem Gesamtvolumen von 100-150 µl PBS in den Kamin einer Cytospin-Apparatur gefüllt und 3 min abzentrifugiert (1.500 rpm, 15°C). Der Objektträger wurde für 1-2 h an der Luft getrocknet, anschließend wurden die Zellen nach Pappenheim gefärbt.

Die Zellen wurden mit 3 ml gefilterter konzentrierter May-Grünwald-Lösung pro Objektträger fixiert, nach 3 min wurde die gleiche Menge an Millipore-Wasser zugegeben. Nach weiteren 2 min Inkubation bei RT wurde der Objektträger mit Millipore-Wasser abgespült und hochkant aufgestellt an der Luft getrocknet. Nun wurde die Giemsa-Lösung für den Gebrauch 1:10 mit Millipore-Wasser verdünnt und 5 ml auf den Objektträger pipettiert. Nach 20 min Inkubation bei RT wurde die Lösung mit Millipore-Wasser abgespült und der Objektträger erneut hochkant zum

Trocknen aufgestellt. Farbreste auf der Rückseite des getrockneten Objektträgers wurden mit Alkohol entfernt. Die Farbstofflösungen Giemsa und May-Grünwald wurden von der Firma Labor und Technik bezogen.

3.7 Virologische Methoden

3.7.1 Virusanzucht von MGV

Zu 50-80 % konfluente Verozellen wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert. Für diesen Zweck wurde das Medium abgenommen und die Zellen in 10 ml MEM ohne FKS mit MGV bei 37°C unter leichtem Schütteln inkubiert. Nach 2 h wurde das Medium abgezogen, 40 ml DMEM/2 % FKS zugegeben und die Zellen bis zum Auftreten eines zytopathischen Effekts bei 33°C im Brutschrank inkubiert. Dabei war es wichtig, daß sich die Zellen nicht vom Boden der Zellkulturflasche ablösen. Nach 3-4 Tagen wurden die infizierten Zellen 1:2 geteilt und erneut bei 33°C inkubiert.

Drei Tage später zeigten ca. 90 % der Zellen einen zytopathischen Effekt. Nun wurde das Medium vorsichtig abgenommen und 4-5 ml steriles 1x PBS zugegeben. Die Zellen wurden für mindestens 2 h bei -20°C eingefroren, um eine Desintegration der Zellen zu erreichen. Durch rasches Auftauen und heftiges Schwenken der abgelösten Eisstücke über den Zellrasen wurden die Zellen aufgebrochen, und damit zellgebundenes Virus freigesetzt. Nach vollständigem Auftauen der Lösung wurde diese mit einer 10 ml-Pipette mehrmals über den Boden der Zellkulturflasche pipettiert, um restliche Zellen abzuspülen. Durch 10-minütige Zentrifugation (3000 rpm, 4°C) wurden die Zelltrümmer vom Virus-haltigen Überstand abgetrennt. Dieser Überstand wurde aliquotiert und bei -80°C eingefroren. Die Viruspräparation wurde möglichst schnell und auf Eis durchgeführt, da Viren allgemein sehr temperaturempfindlich sind. Der Virustiter wurde mit Hilfe eines Plaquetests bestimmt.

3.7.2 MGV-Plaquetest (ICA-Färbung)

Der Plaquetest dient zur quantitativen Bestimmung infektiöser Viruspartikel. Es wurden je 5×10^5 Verozellen pro Napf einer 6-Loch-Platte in einem Gesamtvolumen von 3 ml MEM/5 % FKS ausgesät. Am nächsten Tag hatte sich ein 70-90 % konfluenter Zellrasen gebildet. Von dem zu testenden MGV-Stock wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-6} in MEM-Medium hergestellt. Nach Abnahme des Mediums aus den Näpfen wurden die Zellen mit je 1 ml der Virusverdünnung infiziert und bei 37°C inkubiert. Eine Stunde später wurde das Inokulum abgezogen und 3 ml MEM/5 % FKS pro Napf zugegeben. Nach 48 h Inkubation im

Brutschrank wurde eine intrazelluläre Färbung angesetzt (ICA), wobei das Nukleokapsid angefärbt wurde.

Für die Fixierung der Zellen wurde das Medium abgezogen und 0,5 ml PBS/3,7 % Formaldehyd pro Napf zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Zellen mit je 1 ml Waschpuffer pro Napf für 30 s gewaschen. Anschließend wurden die Zellen für 5 min mit je 0,5 ml PBS/0,25 % Triton pro Napf permeabilisiert und dreimal mit je 1 ml Waschpuffer pro Napf gewaschen. Nun folgte die Nukleokapsidfärbung mit dem Primärantikörper F227. Je 350 µl des F227-Überstandes wurden pro Napf zugegeben und für 1 h bei RT inkubiert. Nach einem Waschschrift wurden je 350 µl des Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpers (anti-Maus) hinzugefügt. Der Antikörper wurde zuvor in Waschpuffer/10 % FKS 1:200 verdünnt. Nach einer einstündigen Inkubation bei RT wurden die Zellen zweimal gewaschen und je 500 µl frisch angesetzte Substratlösung pro Napf zugegeben. Die Rotfärbung der Plaques dauerte 20 min bei RT im Dunkeln. Die Lösung wurde abgenommen und die Färbung unter fließendem Wasser gewaschen. Die Anzahl der Plaques verschiedener Virusverdünnungen wurde unter dem Mikroskop ausgezählt und das Ergebnis in Plaque-bildenden Einheiten (PBE) pro ml angegeben.

3.7.3 Gewinnung von MGV-Antigen

Zum Beschichten von Proliferationsplatten wurde MGV-Antigen in gereinigter Form benötigt. Um eine gute Ausbeute zu erhalten, wurden alle Schritte der Virusreinigung auf Eis und in vorgekühlten Geräten durchgeführt. Das rekombinante MV MGV wurde in großen Mengen gezüchtet (Kapitel 3.7.1) und die Virusstocks wurden in 50 ml Polyallomerröhrchen (Kontron) auf ein Saccharosekissen (5 ml 25 % Saccharose w/w in NTE) gegeben. Die Viruspartikel wurden durch Ultrazentrifugation (1,5 h, 24.000 rpm, 4°C) mit dem Ausschwingrotor vom Typ SW 28 sedimentiert. Das Pellet wurde in 10 ml NTE aufgenommen und durch Ultraschallbehandlung im Branson Sonifier 450 („duty cycle 6“, „output control 30%“) dispergiert. Durch Dichtezentrifugation in einem diskontinuierlichen Saccharosegradienten wurde das Virusmaterial anschließend angereichert. Der Gradient (10 ml 30 %, 10 ml 50 % und 5 ml 60 % Saccharose in NTE) wurde mit der Viruslösung vorsichtig überschichtet und 2 h ultrazentrifugiert (25.000 rpm, 4°C). Auf der 50 %-igen Saccharoseschicht (MGV-Partikel) und auf der 30 %-igen Schicht (Glykoprotein G von VSV) bildete sich eine sichtbare Proteinbande. Die Bande der 50 %-igen Schicht wurde mit einer Kapillare abgenommen. Nach einer 1:3-Verdünnung mit NTE wurde das Proteingemisch erneut ultrazentrifugiert (1,5 h, 24.000 rpm, 4°C). Das Pellet wurde in 11 ml 1x PBS aufgenommen, kurz beschallt und die Proteinkonzentration (Bio-Rad) gemessen. Zur Inaktivierung des Virusmaterials wurde es 15 min mit UV-Licht bestrahlt.

Schließlich wurde das fertige MGV-Antigen aliquotiert und bis zur weiteren Verwendung bei -80°C gelagert.

3.7.4 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentration wurde mit dem Bio-Rad Protein Assay I bestimmt. Das Protein Assay Reagenz (PAR) wurde mit Millipore Wasser im Verhältnis 1:4 verdünnt. Zuerst stellte man den ungefähren Proteingehalt der zu bestimmenden Probe fest, indem folgende Verdünnungen angesetzt wurden:

1. 100 μl PAR
2. 99 μl PAR + 1 μl Protein-Probe
3. 96 μl PAR + 4 μl Protein-Probe

Bei einem Farbumschlag im 2. Ansatz fiel Verdünnung 10 weg. Wurde der Farbumschlag erst im 3. Ansatz sichtbar, so fiel Verdünnung 9 weg. Nun wurden weitere Verdünnungen hergestellt, als Standardprotein wurde bovines Serumalbumin (1 mg/ml) verwendet:

4. 1000 μl PAR
5. 999 μl PAR + 1 μl Standardprotein
6. 995 μl PAR + 5 μl Standardprotein
7. 990 μl PAR + 10 μl Standardprotein
8. 985 μl PAR + 15 μl Standardprotein
9. 990 μl PAR + 10 μl Protein-Probe
10. 960 μl PAR + 40 μl Protein-Probe

Am Photometer wurde bei 595 nm die optische Dichte des entstandenen Farbstoffes gegen den Leerwert gemessen. Die Verdünnungsstufen 4-8 dienten zur Ermittlung einer Eichkurve, aus der die Proteinkonzentration der Probe bestimmt werden konnte.

3.8 Tierexperimentelle Methoden

3.8.1 Intranasale Immunisierung

Für eine intranasale (i. n.) Immunisierung wurden die Tiere in eine Ethernarkose versetzt. Das Inokulum wurde mit Hilfe einer 200 μl Gilson-Pipette und einer Pipettenspitze in die Nasenöffnung des Versuchstieres überführt und sofort vom

Tier eingeatmet. Als Trägermedium für das MV wurde 1x PBS verwendet. Das durchschnittliche Infektionsvolumen betrug 80 µl. Die Tiere waren zum Zeitpunkt der Infektion 6-10 Wochen alt.

3.8.2 Intraperitoneale Injektion

Die Tiere wurden in eine Ethernarkose versetzt. Anschließend wurde die intraperitoneale (i. p.) Injektion mit einer sterilen Einwegspritze in den unteren linken Quadranten des Abdomens durch die Bauchdecke in die Bauchhöhle verabreicht. In diesem Quadranten befinden sich keine lebenswichtigen Organe. Die Bauchdecke wurde dafür mit der freien Hand leicht angehoben. Das Trägermedium der zu injizierenden Substanz war 1x PBS.

3.8.3 Entnahme lymphoider Organe

Die Versuchstiere wurden durch CO₂-Inhalation getötet. Zur Entnahme von Milz und Thymus wurden Peritonealhöhle und Brustkorb semi-steril geöffnet und nach Instrumentenwechsel die Organe entnommen. Die Mandibular-Lymphknoten wurden nach semi-sterilem Öffnen der Haut aus dem subkutanen Gewebe präpariert.

3.8.4 Präparation von Milz-, Thymus- und Lymphknotenzellen

Mit sterilen Pinzetten wurden Milz, Thymus und Lymphknoten von anhaftendem Gewebe befreit. Die Milz wurde halbiert und die Lymphknotenkapseln mittels eines sterilen Skalpells mehrfach eingeschnitten. Um die Zellen zu vereinzeln, wurden die Organe mit Hilfe steriler Spritzenkolben durch sterile Stahlsiebe gestrichen. Die Zellsuspensionen wurden jeweils in 40 ml Waschpuffer aufgenommen und für 10 min (1.000 rpm, 15 °C) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang noch zweimal wiederholt. Während des letzten Waschgangs wurden die Zellen gezählt und schließlich je nach Verwendungszweck eingesetzt.

3.8.5 Blutentnahme und Serumgewinnung

Die Blutentnahme erfolgte unter Ethernarkose aus dem retroorbitalen Plexus. Getöteten Tieren wurde durch Herzpunktion Blut entnommen. Zur Serumgewinnung wurde das Blut direkt in Röhrchen („serum separator tubes“, Mikrotainer) überführt und 20 s (14.000 rpm, RT) zentrifugiert. Die Seren wurden abgenommen und bei -20°C oder +4°C gelagert.

3.8.6 Applikation von DNFB auf die Haut

Die Applikation erfolgte unter Ethernarkose mit Hilfe einer 200 µl Gilson-Pipette und einer Pipettenspitze. Die Rückseite eines Ohres oder die mittels eines Kurzhaarschneiders rasierte Flanke des Versuchstieres wurde mit je 40 µl DAE/1-2 % DNFB befeuchtet. Dabei war es wichtig, die Tiere noch 1-2 min nach der Befeuchtung in Narkose zu halten, damit die Lösung trocknen und nicht auf andere Körperstellen transferiert werden konnte.

4. Ergebnisse

4.1 Etablierung und Charakterisierung eines neuen transgenen Mausmodells mit Tetrazyklin-induzierbarer gewebespezifischer Expression von Masernvirus-Glykoproteinen („TetOn“-System)

4.1.1 Experimentelle Strategie zur Herstellung und Testung von Masernvirus-Glykoproteinen-exprimierenden Mäusen

Abbildung 3 zeigt die experimentelle Strategie zur Herstellung und Testung von transgenen Mäusen mit Tetrazyklin-induzierbarer gewebespezifischer Expression der Masernvirus (MV)-Glykoproteine Fusionsprotein (F) und Hämagglutinin (H).

4.1.2 Herstellung der transgenen Mauslinien mit F und H von MV

Herstellung des injizierten Fragments für die Mikroinjektion

Zur Herstellung der transgenen Mauslinien mit den Glykoproteinen F und H von MV, unter der Kontrolle eines Transaktivator-abhängigen Promotors, wurde das Plasmid pBI4_lifih6 von Andrew Davidson (Bristol) kloniert. Der 8,8 kb große Vektor wurde mit den Enzymen *Pfi*MI (nt 3.505) und *Sfi*I (nt 5.826) geschnitten. Das entstandene 6.467 bp große Fragment wurde aus einem Agarosegel isoliert, gereinigt und für die nachfolgende Mikroinjektion eingesetzt.

Das injizierte Fragment ist in Abbildung 4 dargestellt. Es enthält die beiden Glykoproteine F und H von MV-Wildtyp WTF, in entgegengesetzter Orientierung, unter der Kontrolle eines Transaktivator-abhängigen bidirektionellen Promotors (TetOn-System). Der Transaktivator *rtTA* (reverser Tetrazyklin-abhängiger Transkriptionsaktivator) bindet in Gegenwart von Tetrazyklin an das Transaktivator-abhängige Element TRE, welches sich in der Mitte des Promotors befindet und aus 7 Kopien des Tetrazyklin-Operators besteht. Beidseitig ist jeweils ein Minimalpromoter des Zytomegalievirus (CMV) angebracht. Dieser Minimalpromoter unterscheidet sich vom kompletten CMV-Promotor durch das Fehlen der Verstärkersequenz. Voraussetzung für eine effiziente Expression der

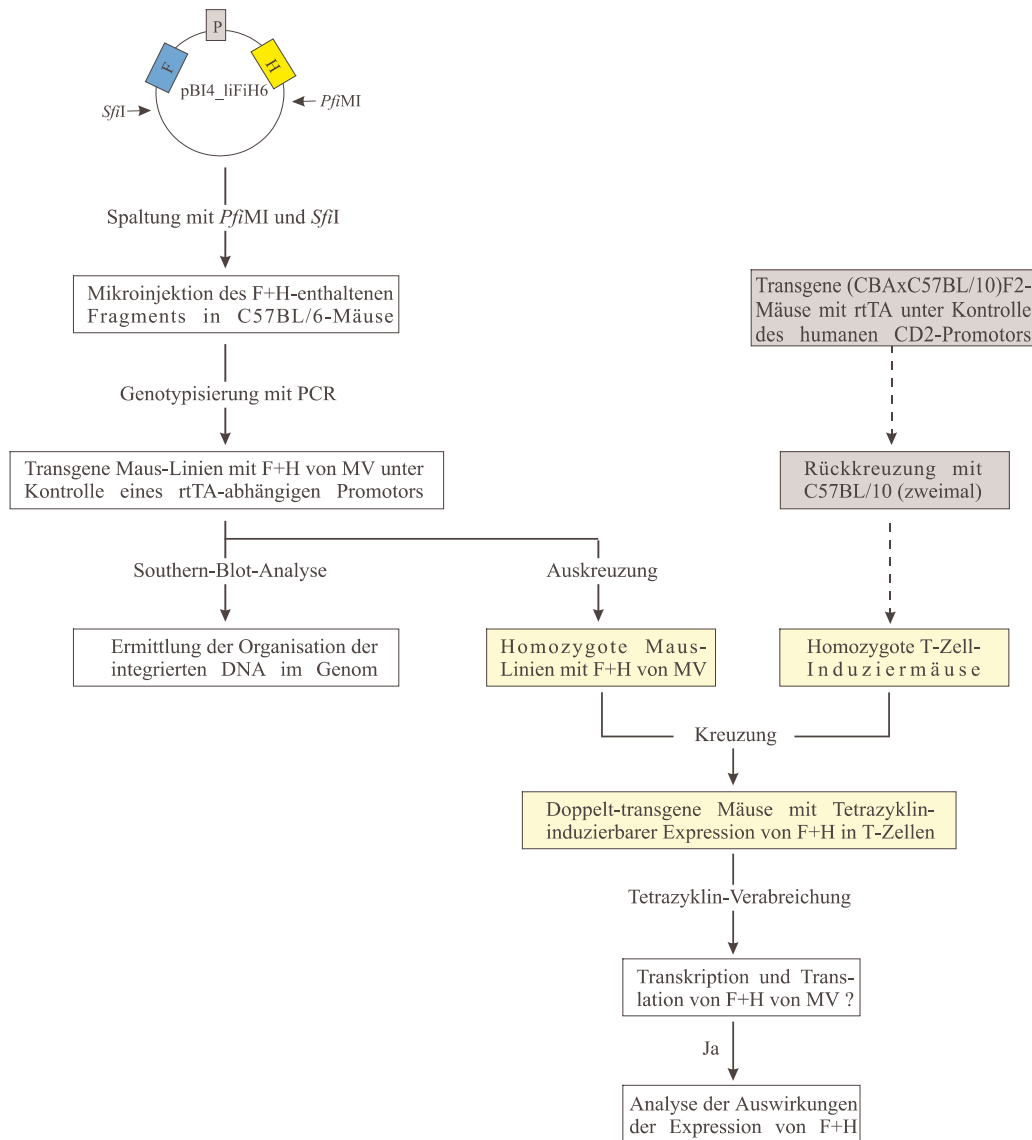


Abbildung 3: Experimentelle Strategie zur Herstellung und Testung von transgenen Mäusen mit Tetrazyklin-induzierbarer Expression von F und H in T-Zellen (TetOn-System).

Der rechte obere Teil des Flussdiagrammes (graue Text-Kasten mit gestrichelten Pfeilen) bezieht sich auf die gewebespezifischen Induziermäuse, die von Rose Zamoyska hergestellt und getestet wurden (Legname et al., 2000). Nach Kreuzung dieser Tiere mit Mäusen, die das Luziferase-codierende Gen unter Kontrolle des rtTA-abhängigen Promotors trugen, konnte eine signifikante Luziferaseaktivität in Milz und Thymus gemessen werden, nicht aber in Leber, Herz und Lunge (Legname et al., 2000). Das regulatorische Element des humanen CD2-Promotors induziert, zusammen mit dem Promotor selbst, die Expression von Reportergenen auf der Oberfläche fast aller einfach positiver CD4⁺CD8⁻ und CD4⁺CD8⁺ reifer T-Lymphozyten in transgenen Mäusen (Zhumabekov et al., 1995).

Abkürzungen: MV: Masernvirus; F: Fusionsprotein von MV; H: Hämagglutinin von MV; SfiI, PfiMI: Schnittstellen; rtTA: reverser Tetrazyklin-abhängiger Transkriptionsaktivator (TetOn-System); P: rtTA- bzw. Transaktivator-abhängiger bidirektionaler Promotor.

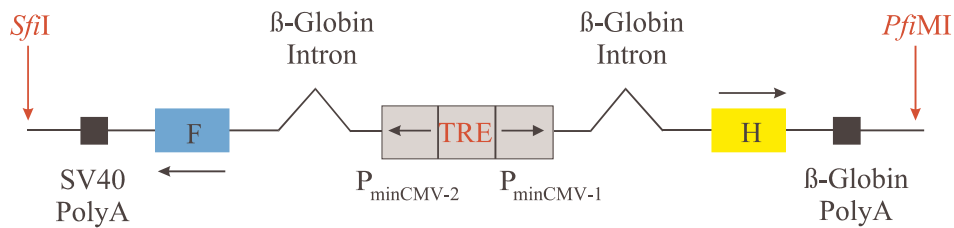


Abbildung 4: Graphische Darstellung des injizierten Fragments zur Herstellung transgener Mäuse mit den MV-Glykoproteinen Fusionsprotein und Hämagglutinin.

Abkürzungen: TRE: Transaktivator-abhängiges Element (TetOn-System); $P_{minCMV-1/2}$: Minimalpromotor von Zytomegalievirus; F: Fusionsprotein von MV-Wildtypstamm WTF; H: Hämagglutinin von MV-Wildtypstamm WTF; PolyA: Polyadenylierungssignal; SfiI, PfiMI: Schnittstellen.

MV-Glykoproteine F und H im eukaryotischen System sind zwei β -Globin-Introns, die zwischen Promotor und den Transgenen F und H liegen. Zusätzlich sind zwei Polyadenylierungssignale am Transkriptions-3'-Ende vorhanden, um eine starke Expression der Transgene zu bewirken.

Expressionsanalyse des Plasmides pBI4_liFiH6 *in vitro*

Der Vektor pBI4_liFiH6 wurde vor der Mikroinjektion auf die Expression der H- und F-Gene *in vitro* von Andrew Davidson überprüft. Dazu wurden HeLa rtTA-Zellen mit diesem Vektor transient transfiziert und 48 h später geerntet. Im Western-Blot konnte eine starke Expression von F und H nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Sensitivität der PCR

Mit dem Konstrukt pBI4_liFiH6 sollten transgene Mäuse hergestellt werden, deren Genotyp mit Hilfe der PCR bestimmt werden sollte. Aus diesem Grund wurde im Rahmen dieser Arbeit eine PCR etabliert und auf ihre Sensitivität getestet. Dies war wichtig, um zu überprüfen, ob mit dieser Methode auch eine einzelne Kopie des Transgens nachweisbar ist.

Die PCR wurde in einem Gesamtvolumen von 50 μ l angesetzt, als „template“ wurde der Vektor pBI4_liFiH6 verwendet. Um die Sensitivität der PCR zu überprüfen, wurde die DNA in Zehner-Schritten titriert (ausgehend von 1 fg bis 0,1 ng). Die eingesetzten Oligonukleotide MV13/MV38 binden im Fusionsprotein von MV. Das erwartete 1,1 kb-Fragment entstand bei allen verwendeten Plasmidkonzentrationen (Abbildung 5). Die Masse einer einzelnen Kopie des kompletten Vektors

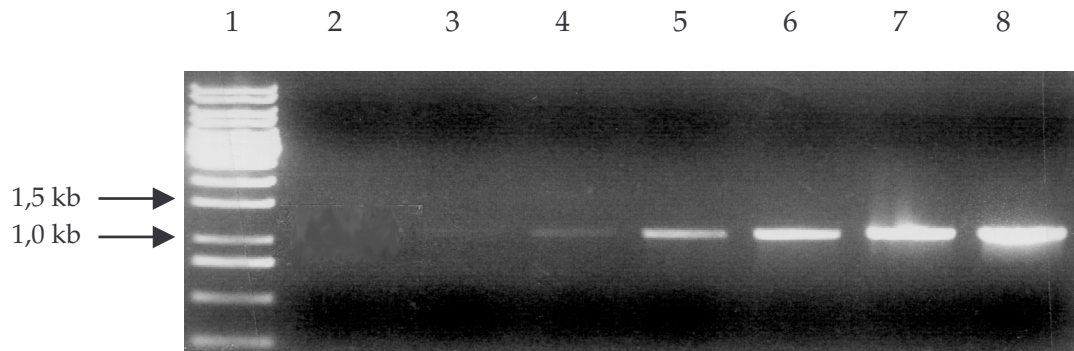


Abbildung 5: Überprüfung der PCR-Sensitivität durch Amplifikation eines 1,1 kb großen Fragments des Fusionsproteins von MV (Oligonukleotide MV13/MV38).

- Spur1: 1 kb-Marker
- Spur2: Negativkontrolle, ddH₂O
- Spur3: 1 fg von Plasmid pBI4_liFiH6
- Spur4: 10 fg von Plasmid pBI4_liFiH6
- Spur5: 0,1 pg von Plasmid pBI4_liFiH6
- Spur6: 1 pg von Plasmid pBI4_liFiH6
- Spur7: 10 pg von Plasmid pBI4_liFiH6
- Spur8: 0,1 ng von Plasmid pBI4_liFiH6

pBI4_liFiH6 beträgt 14,7 pg, die des injizierten Fragments 10,8 pg¹. Da bereits 1 fg Vektor-DNA mittels PCR nachweisbar war, konnte gezeigt werden, daß diese PCR sensitiv genug für die Genotypisierung einzelner Kopien der inserierten Transgene ist.

Herstellung der transgenen Mauslinien durch Mikroinjektion

Die Mikroinjektion wurde von der Firma RCC (Schweiz) durchgeführt. Das gereinigte 6,5 kb große Fragment wurde in 780 befruchtete Mausooocyten injiziert. Anschließend wurden diese Eier in „Leihmütter“ implantiert; dafür wurde der Mausstamm C57BL/6 verwendet. Aus den 780 Mikroinjektionen gingen nur 102 Mäuse hervor. Diese wurden von RCC mit Hilfe der PCR und den Oligonukleotiden MV13/MV38 genotypisiert. Die genomische DNA wurde mit Hilfe von Schwanzbiopsien gewonnen. Nur vier Tiere der geborenen Mäuse enthielten das injizierte Fragment in ihrem Genom.

¹ Die Masse einer einzelnen Kopie wird nach folgender Formel berechnet (<http://www.med.umich.edu/tamc/spike.html>):

$$\text{Masse der transgenen DNA} = \frac{N \text{ bp transgene DNA} \cdot 5 \mu\text{g genomische DNA}}{3 \cdot 10^9 \text{ bp genomische DNA}}$$

Die transgenen Mäuse erhielten die Bezeichnung „C57BL/6-TgN(M-HF/TRE)#1-4 vim“. Diese Bezeichnung drückt aus, daß das Hämagglutinin (H) und Fusionsprotein (F) von Masernvirus (M) und das Transaktivator-abhängige Element TRE in C57BL/6-Mäuse inseriert waren. Die Integration dieser Transgene (Tg) erfolgte über nicht-homologe Insertion (N). Es wurden 4 transgene Mäuse (#1-4) in der Virologie und Immunbiologie der Universität in Würzburg (vim) hergestellt. Zur Identifikation wurden diese Mäuse den Linien 1-4 zugeordnet.

Phänotyp der transgenen Mauslinien 1, 2, 3 und 4

Von den 4 transgenen Mäusen unterschied sich nur Linie 1 phänotypisch vom Wildtypstamm C57BL/6. Dieses Tier besaß nur ein Auge und das Rückenfell wies kahle Stellen auf (Abbildung 6). Das Verhalten und die Reflexe der vier transgenen Mäuse waren unauffällig.

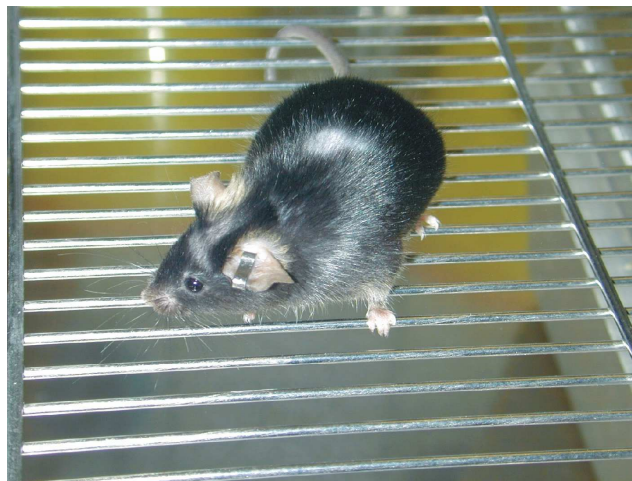


Abbildung 6: Phänotyp von Mauslinie 1.

4.1.3 Genotypisierung der transgenen Mäuse mit Hilfe der PCR

Nachweis des Transgens F im Genom der transgenen Mäuse

Die Integration des injizierten Fragments wurde mit Hilfe der PCR erneut überprüft. Es wurden Biopsien der Mäuseohren entnommen und die genomische DNA präpariert. Pro PCR-Ansatz wurden 3,5 µl genomische DNA (entspricht ca. 350 ng) eingesetzt. Die PCR wurde in dem üblichen Gesamtvolumen von 100 µl mit den Oligonukleotiden MV13/MV38 durchgeführt. Als Positivkontrolle diente der Vektor pBI4_liFiH6 mit den Glykoproteinen F und H von MV. Das Fusionsprotein

von MV wurde durch das 1,1 kb große PCR-Produkt nachgewiesen, es entstand bei allen 4 transgenen Mäusen. Abbildung 7 zeigt die Daten von Linie 1. Zur Überprüfung der isolierten genomischen DNA wurde eine zusätzliche PCR mit den Oligonukleotiden 3'- und 5'-GAPDH durchgeführt, die in dem konstitutiv exprimierten Enzym Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase binden. Es entstand das erwartete 530 bp große Fragment.

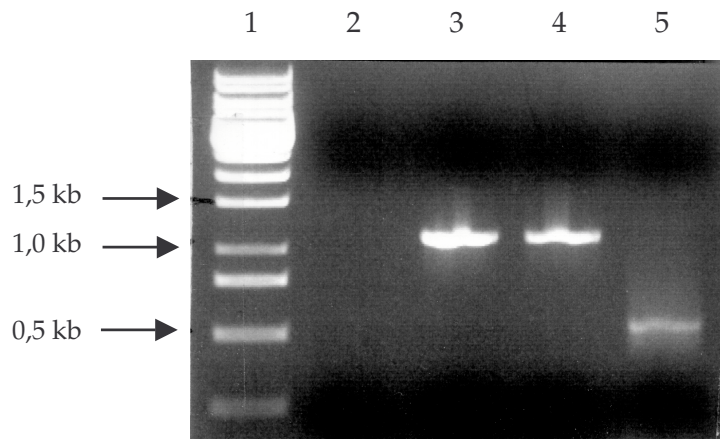


Abbildung 7: Nachweis des Transgens F in Linie 1 durch Amplifikation eines 1,1 kb großen Fragments des Fusionsproteins von MV (Oligonukleotide MV13/MV38).

Spur 1: 1 kb-Marker

Spur 2: Negativkontrolle, ddH₂O

Spur 3: Positivkontrolle, Plasmid pBI4_liFiH6

Spur 4: genomische DNA von Linie 1

Spur 5: Positivkontrolle, genomische DNA von Linie 1
(Oligonukleotide 3'-/5'-GAPDH)

Nachweis des vollständig inserierten Fragments

Der Nachweis des integrierten Fusionsproteins von MV sagte nichts darüber aus, ob das 6,5 kb große Fragment vollständig in das Genom der transgenen Mäuse inseriert worden war. Um dies zu überprüfen, wurden zusätzliche PCR-Reaktionen durchgeführt. Verschiedene Oligonukleotidkombinationen wurden so gewählt, daß die Integration des vollständigen Fragments mittels PCR nachgewiesen werden konnte (gelelektrophoretische Auftrennung ist nicht dargestellt). Abbildung 8 zeigt eine graphische Darstellung von tandemartig integrierten Fragmenten und den jeweiligen mittels PCR nachgewiesenen Bereichen. In Tabelle 4 in Kapitel 2.5 sind die verwendeten Oligonukleotidkombinationen mit Bindungsort, PCR-Bedingungen und Größe der PCR-Produkte aufgeführt.

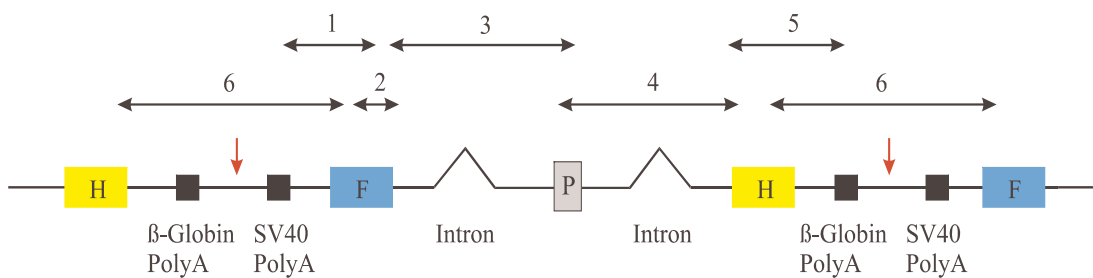


Abbildung 8: Graphische Darstellung des Nachweises der Integration vollständiger Fragmente in das Mausgenom mit Hilfe der PCR. Die Abbildung zeigt tandemartig integrierte Fragmente, ein vollständiges Fragment wird durch rote Pfeile abgegrenzt. Die nummerierten Pfeile deuten die nachgewiesenen Fragmentbereiche an. Folgende Oligonukleotidkombinationen wurden dafür verwendet: 1: SV40-F1/MV38.a; 2: MV13/MV38; 3: MV39/P_{bit}; 4: P_{bit}/H21; 5: H29/B-Globin1; 6: H34/MV38.c.

Abkürzungen: P: Transaktivator-abhängiger bidirektionaler Promotor; F: Fusionsprotein von MV; H: Hämagglutinin von MV; PolyA: Polyadenylierungssignal.

4.1.4 Organisation der integrierten DNA im Genom

Ermittlung der Integrationshäufigkeit über PCR

Um eine Aussage darüber machen zu können, ob das injizierte Fragment als einzelne Kopie (single-copy) oder mehrmals hintereinander (multiple-copy) in das Genom der transgenen Mäuse integriert worden war, wurde folgende PCR-Strategie angewendet:

Durch Verwendung bestimmter Oligonukleotidkombinationen war die Entstehung eines PCR-Produktes nur im Falle einer multiple-copy Integration möglich, nicht bei einer single-copy Integration. Die Primer MV38.b (bindet im Fusionsprotein) und H34 (bindet im Hämagglutinin) wurden so konstruiert, daß die Amplifikation in entgegengesetzte Richtung erfolgte. Dadurch war die Entstehung eines PCR-Produktes nur im Falle einer multiple-copy Integration möglich (Abbildung 9).

Da bei allen vier transgenen Mäusen kein PCR-Produkt entstand, wurde zur Steigerung der Sensitivität eine semi-nested PCR durchgeführt. Dabei wurden je 5 µl der ersten PCR mit den Oligonukleotiden MV38.c (bindet im Fusionsprotein) und H34 (bindet im Hämagglutinin) eingesetzt. Bei den Tieren der Linie 1, 2 und 4 wurde durch die Entstehung eines 1 kb großen Fragments eine multiple-copy Integration nachgewiesen. Im Gegensatz dazu wurde bei Linie 3 eine single-copy im Genom gezeigt (Abbildung 10).

Das ca. 1 kb große PCR-Produkt resultierte aus einer 5'-3', 5'-3'-Integration von mindestens zwei Fragmenten hintereinander. Es ergab sich aus der Addition der

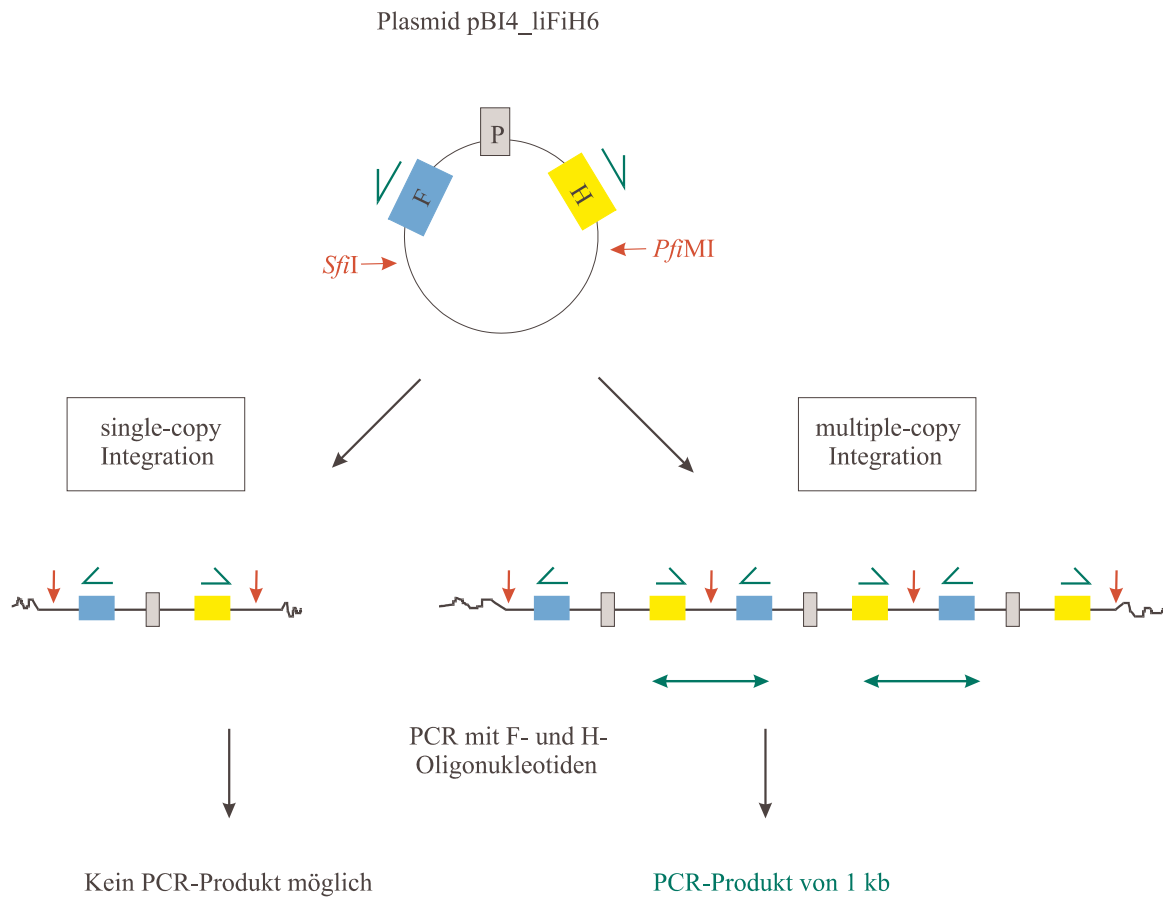


Abbildung 9: Strategie zur Ermittlung der Integrationshäufigkeit des injizierten Fragments in das Genom der transgenen Mäuse mittels PCR. Die Abbildung zeigt schematisch stark vereinfachte integrierte Fragmente, in single-copy bzw. multiple-copy Form. Ein Fragment wird durch die roten Pfeile abgegrenzt. Die genomische Maus-DNA ist durch die Wellenlinie angedeutet. Nach PCR mit F- und H-Oligonukleotiden entsteht im Falle einer multiple-copy Integration ein PCR-Produkt von 1 kb (dargestellt durch grüne Pfeile). Die Oligonukleotide sind durch grüne Haken angedeutet.

Abkürzungen: F: Fusionsprotein von MV; H: Hämagglutinin von MV; P: bidirektioneller Transaktivator-abhängiger Promtor; SfiI und PfiMI: Schnittstellen.

Fragmente von 400 bp (Hämagglutininrest mit β -Globin PolyA-Signal) und 640 bp (Fusionsproteinrest mit SV40 PolyA-Signal). Diese tandemartige Anordnung wird bei der Integration von mehreren Fragmenten in aller Regel beobachtet (Palmiter and Brinster, 1986; Hammes and Schedl, 2000). Bei einer 5'-3', 3'-5'-Integration wäre ein 1,3 kb (2 x 640 bp) oder 0,8 kb (2 x 400 bp) großes Fragment entstanden.

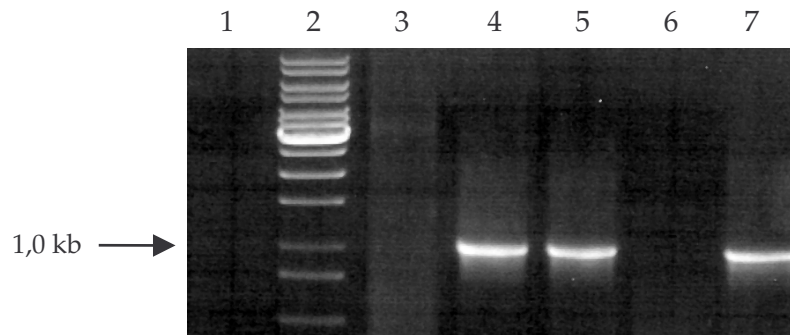


Abbildung 10: Ermittlung der Integrationshäufigkeit in transgenen Mäusen der Linie 1-4 mit Hilfe einer semi-nested PCR. Die Entstehung eines 1 kb großen Fragments beweist eine multiple-copy Integration (Oligonukleotide MV38.c/H34).

Spur 1: Negativkontrolle, ddH₂O

Spur 2: 1 kb-Marker

Spur 3: Positivkontrolle, Plasmid pBI4_liFiH6 (schwache Bande bei 3,3 kb)

Spur 4: genomische DNA von Linie 1

Spur 5: genomische DNA von Linie 2

Spur 6: genomische DNA von Linie 3

Spur 7: genomische DNA von Linie 4

Ermittlung der Kopienanzahl über Southern-Blot-Analyse

Die genaue Anzahl der integrierten Kopien in das Genom der Mäuse wurde mit Hilfe einer Southern-Blot-Analyse bestimmt. Für diesen Zweck wurde genomische DNA der vier transgenen Mäuse mit einem Restriktionsenzym gespalten, welches innerhalb des integrierten Fragments schneidet (*EcoRI*) und über Southern-Blot analysiert. Es wurde gegen ein 1,1 kb großes Fragment des Fusionsproteins hybridisiert. Die dafür verwendete DNA-Sonde wurde mit Hilfe einer PCR mit den Oligonukleotiden MV13/MV38 und dem Vektor pBI4_liFiH6 hergestellt. Anschließend wurde diese Sonde präzipitiert, gewaschen und mit alkalischer Phosphatase markiert (Kapitel 3.3).

Es wurden je 5 µg genomische DNA der Linie 1-4 mit *EcoRI* gespalten, präzipitiert und gelelektrophoretisch aufgetrennt. Dieses Enzym schneidet das integrierte Fragment an vier verschiedenen Stellen zwischen den beiden Glykoproteinen (an Position 6, 570, 1.282 und 8.105), das Fusionsprotein bleibt dabei komplett erhalten. Dies war für die Hybridisierung mit der DNA-Sonde wichtig.

Als Kopienstandard diente der *EcoRI*-linearisierte Vektor pBI4_liFiH6, der in verschiedener Kopieausführung (1, 5 bzw. 10 Kopien) zusammen mit je 5 µg *EcoRI*-geschnittener genomischer DNA einer C57BL/6-Maus eingesetzt wurde. Nach Hybridisierung entstand eine 7 kb-Bande mit unterschiedlicher Intensität, abhängig von der Kopienanzahl. Sie ergab sich nach dem *EcoRI*-Verdau aus den Nukleotiden 1.282 bis 8.105. Zur Ermittlung der Kopienanzahl wurde die Intensität der entstandenen Fragmente von Linie 1-4 mit der Intensität des Kopienstandards

verglichen. Die mit der PCR festgestellte einzeln integrierte Kopie des Transgens in Linie 3 konnte mit Hilfe der Southern-Blot-Analyse bestätigt werden (Abbildung 11). Im Gegensatz dazu exprimierten die Linien 1, 2 und 4 etwa 10 Kopien pro haploidem Genom (Daten nicht dargestellt).

4.1.5 Auskreuzung der heterozygoten Mäuse zu homozygoten Linien

Um homozygote Linien zu erhalten, wurden zuerst die vier männlichen transgenen Mäuse der Linie 1-4 mit jeweils 3 weiblichen C57BL/6-Mäusen gekreuzt. Von allen transgenen Mäusen konnten Nachkommen gezüchtet werden. Sie wurden zur Identifikation bestimmten Nummern zugeordnet, die ihnen mittels Ohrmarken eingestanzelt wurden. Die DNA der geborenen Tiere wurde über PCR mit den Oligonukleotiden MV13/MV38 analysiert. Alle vier transgenen Mäuse konnten das Transgen an ihre Nachkommen vererben, allerdings waren von 39 F1-Nachkommen der Linie 2 nur 5 Tiere transgen.

Nach der 1. Mendelschen Regel sind in der F1-Generation eines heterozygoten und eines Wildtypelternteils ungefähr 50 % der Tiere für das Transgen heterozygot. Bei mehreren Integrationsstellen würde diese Zahl deutlich höher liegen. Da dies bei keiner Linie der Fall war, war die Integration des injizierten Fragments in nur eine Stelle des Genoms sehr wahrscheinlich.

Pro Linie wurden mindestens 2 heterozygote Mäuse der F1-Generation untereinander verpaart. Nach der 2. Mendelschen Regel wird unter der F2-Generation folgende Aufspaltung erwartet: 25 % der Nachkommen entsprechen dem Wildtyp, 25 % sind in Bezug auf das Transgen homozygot und weitere 50 % sind heterozygot. Zuerst wurden die Wildtypmäuse über PCR mit den Oligonukleotiden MV13/MV38 identifiziert. Zur Unterscheidung von homo- und heterozygoten Tieren wurden als nächstes je 5 µg genomische DNA der transgenen Tiere mit *EcoRI* gespalten und mit Hilfe des Southern-Blots analysiert. Wie bereits in Kapitel 4.1.4 beschrieben, wurde gegen ein 1,1 kb großes Fragment des Fusionsproteins hybridisiert. Abbildung 11 zeigt die Southern-Blot-Analyse zur Ermittlung von homo- und heterozygoten Tieren der Linie 3. Nach der Filmentwicklung entstand bei homozygoten Tieren ein stärkeres Signal, als bei heterozygoten Tieren. Die Mäuse der Linie 3 mit den Nummern 317, 335 und 336 wurden als homozygote Tiere identifiziert. Die ca. 7 kb-Bande setzte sich aus dem 2,2 kb großen Fusionsprotein-enthaltendem Randstück und den flankierenden genomischen Sequenzen zusammen. Die fehlende Bande des 1-fachen Kopienstandards erklärte das Fehlen einer eindeutigen Bande bei Maus Nr. 337, welche demzufolge ebenfalls nur eine einzelne Kopie besaß und somit als Heterozygot eingestuft wurde. Der in Abbildung 11 dargestellte Southern-Blot war nicht sensitiv genug, um einzelne Kopien des Transgens nachzuweisen.

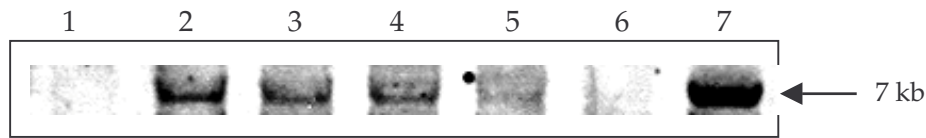


Abbildung 11: Southern-Blot-Analyse zur Ermittlung von homo- und heterozygoten Tieren der F2-Generation von Linie 3 (Hybridisierungstemperatur: 58°C, Expositionszeit: 90 min).

Spur 1: Negativkontrolle, 5 μ g EcoRI-geschnittene genomische DNA einer C57BL/6-Maus

Spur 2: 5 μ g EcoRI-geschnittene genomische DNA von Nr. 317 (Homozygot)

Spur 3: 5 μ g EcoRI-geschnittene genomische DNA von Nr. 335 (Homozygot)

Spur 4: 5 μ g EcoRI-geschnittene genomische DNA von Nr. 336 (Homozygot)

Spur 5: 5 μ g EcoRI-geschnittene genomische DNA von Nr. 337 (Heterozygot)

Spur 6: Positivkontrolle, 1-facher Kopienstandard

Spur 7: Positivkontrolle, 5-facher Kopienstandard

Es stellte sich heraus, daß die Linie 2 in homozygoter Form nicht züchtbar war. Die 10 überlebenden F2-Nachkommen dieser Linie waren Wildtypmäuse. Die restlichen 5 Nachkommen starben kurz nach der Geburt bzw. wurden von der Mutter getötet. Aus diesem Grund war es nicht möglich, eine homozygote Linie 2 aufzubauen.

4.1.6 Analyse der Transkription in den transgenen Mäusen der Linien 1-4

Obwohl theoretisch die Expression des Transgens ohne den Transaktivator rtTA nicht möglich ist, kann es, je nach Integrationsort, zur akzidentellen Transaktivierung des Transgens kommen (sogenannte Leakiness). In diesem Fall ist der bidirektionelle Promotor (mit den beiden Minimalpromotoren von CMV) auch ohne rtTA aktiv, so daß eine Transkription von F- und H-mRNA stattfinden kann.

Um dies zu überprüfen, wurde aus homozygoten Mäusen der Linie 1, 3 und 4 und aus heterozygoten Mäusen der Linie 2 die Gesamt-RNA aus Milz und Thymus isoliert. Die RNA wurde gereinigt und über reverse Transkription in cDNA umgewandelt. Mit Hilfe der PCR wurde nun kontrolliert, ob die Introns des integrierten Fragments gespleißt wurden. Abbildung 12 zeigt die dafür verwendeten Oligonukleotidkombinationen. Ein Primerpaar bindet im Hämagglutinin (H21) und in der Nähe des Intron 1 (Intron1). Das andere Primerpaar bindet im Fusionsprotein (MV39) und in der Nähe des Introns 2 (Intron2). Beide Oligonukleotidpaare waren so orientiert, daß eine Amplifikation in aufeinanderzulaufende Richtung stattfand. Im Falle der Transkription von F- und H-mRNA und des damit verbundenen Spleißens wurde ein PCR-Produkt mit der

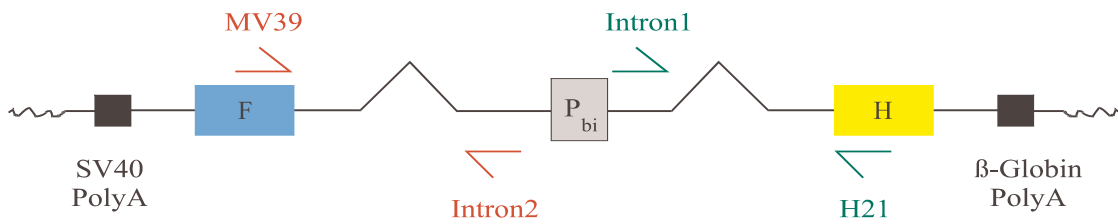


Abbildung 12: Strategie der Transkriptionsanalyse in transgenen Mäusen mittels PCR. Die Abbildung zeigt ein integriertes Fragment und die verwendeten Oligonukleotidkombinationen (dargestellt durch grüne und rote Haken). Die genomische Maus-DNA ist durch die Wellenlinie angedeutet. Im Falle einer Transkription von F- und H-mRNA werden beide Introns gespleißt und es entsteht ein PCR-Produkt von 330 bp bzw. 480 bp.

Abkürzungen: P_{bi} : Transaktivator-abhängiger bidirektionaler Promotor; F: Fusionsprotein von MV; H: Hämagglutinin von MV; PolyA: Polyadenylierungssignal; MV39, H21, Intron1/2: Oligonukleotidbezeichnungen.

Masse von 480 bp (H21/Intron1) bzw. 330 bp (MV39/Intron2) erwartet. Bei fehlender Transkription war nur die Entstehung eines größeren PCR-Produkts von 0,9 kb bzw. 1 kb möglich. Dieses Fragment konnte aufgrund einer Kontamination der RNA mit genomischer DNA entstehen.

Bei den verschiedenen Mauslinien konnte durch die Entstehung des größeren PCR-Produkts bzw. durch das Fehlen des 330 bp und 480 bp großen Fragments nachgewiesen werden, daß das TetOn-System nicht leaky war. Abbildung 13 zeigt die gelelektrophoretische Auftrennung der Thymiprüben, die Milzpräparate waren identisch (Daten sind nicht dargestellt). In den transgenen Mäusen der Linie 1-4 fand keine Transkription von F- und H-mRNA in Milz und Thymus statt.

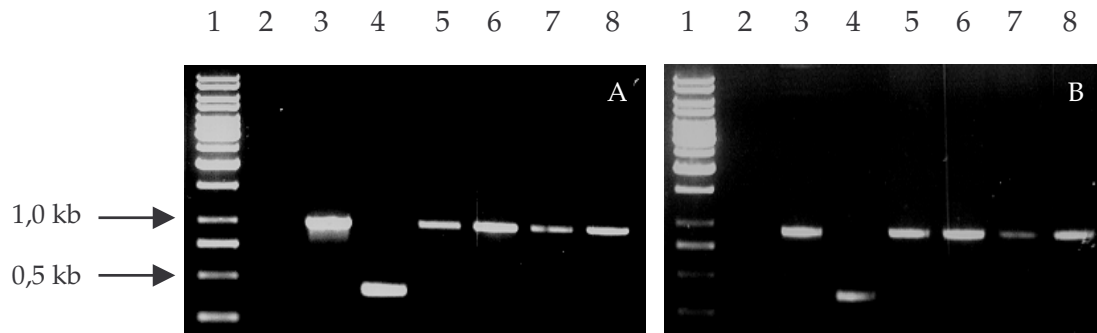


Abbildung 13: Überprüfung der Leakiness im Thymus von transgenen Mäusen der Linie 1-4 mit Hilfe von Transkriptionsanalysen der F- und H-mRNA.

A: Es wurden die Oligonukleotide H21 und Intron1 verwendet, die erwartete Produktgröße betrug 1 kb (fehlende Transkription) bzw. 480 bp (Transkription von H-mRNA).

B: Es wurden die Oligonukleotide MV39 und Intron2 gewählt, die erwartete Produktgröße betrug 0,9 kb (fehlende Transkription) bzw. 330 bp (Transkription von F-mRNA).

Spur 1: 1 kb-Marker

Spur 2: Negativkontrolle, cDNA einer C57BL/6-Maus

Spur 3: Positivkontrolle, Plasmid pBI4_lifH6

Spur 4: Positivkontrolle, cDNA von transient transfizierten HeLa rtTA-Zellen mit pBI4_lifH6

Spur 5: cDNA von Linie 1

Spur 6: cDNA von Linie 2

Spur 7: cDNA von Linie 3

Spur 8: cDNA von Linie 4

4.1.7 Herstellung von doppelt-transgenen Mäusen mit Tetrazyklin-induzierbarer gewebespezifischer Expression von F und H

Zur Herstellung von doppelt-transgenen Mäusen mit Tetrazyklin-induzierbarer gewebespezifischer Expression von F und H wurden sechs gewebespezifische Induziermäuse von Rose Zamoyska (England) bezogen. Die Mäuse enthalten die TetOn Transaktivatordomäne rtTA unter Kontrolle des regulatorischen Elements des humanen CD2-Promotors (Legname et al., 2000) (Abbildung 3). Dieses Element löst die Expression von Reportergenen auf der Oberfläche fast aller einfach positiver CD4⁺CD8⁻ und CD4⁺CD8⁺ reifer T-Lymphozyten in transgenen Mäusen aus (Zhumabekov et al., 1995).

Die homozygoten T-Zell-Induziermäuse der Linie rtTA-C (Nummern 11-16) besitzen 3 Kopien des Transaktivators (Legname et al., 2000). Zuerst wurde der

Transaktivator rtTA in diesen Mäusen überprüft. Zu diesem Zweck wurden Biopsien der Mäuseohren entnommen und genomische DNA isoliert. Mit Hilfe der PCR und den Oligonukleotiden VA2-fwd/VA2-rvs wurde der Transaktivator durch das 270 bp große PCR-Produkt nachgewiesen (Abbildung 14).

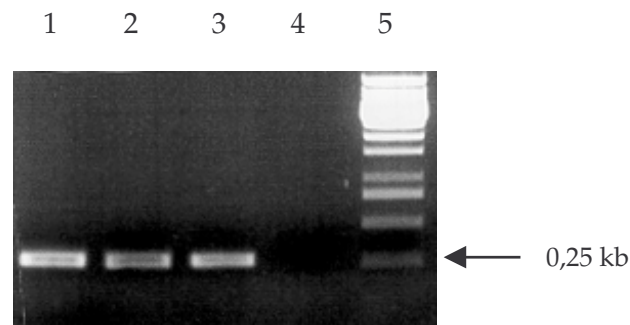


Abbildung 14: Nachweis des Transaktivators rtTA in T-Zell-Induziermäusen mittels PCR. Es wurden die Oligonukleotide VA2-fwd/VA2-rvs verwendet, die erwartete Produktgröße betrug 270 bp.

Spur 1: genomische DNA von Induziermaus Nr. 11

Spur 2: genomische DNA von Induziermaus Nr. 12

Spur 3: genomische DNA von Induziermaus Nr. 13

Spur 4: Negativkontrolle, genomische DNA einer C57BL/6-Maus

Spur 5: 1 kb-Marker

Um doppelt-transgene Mäuse zu erhalten, wurden als nächstes homozygote transgene Mäuse der Linie 1, 3 und 4 mit homozygoten T-Zell-Induziermäusen der Linie rtTA-C gekreuzt (Abbildung 15). Die DNA der geborenen Tiere wurde über PCR analysiert. Mit den Oligonukleotiden MV13/MV38 wurde das Fusionsprotein von MV nachgewiesen, die Oligonukleotide VA2-fwd/VA2-rvs bestätigten den Transaktivator rtTA (Daten nicht dargestellt). Von den Linien 1, 3 und 4 konnten doppelt-transgene Nachkommen gezüchtet werden. Diese waren, wie erwartet, zu 100 % heterozygot für das Transgen F/H und den Transaktivator rtTA.

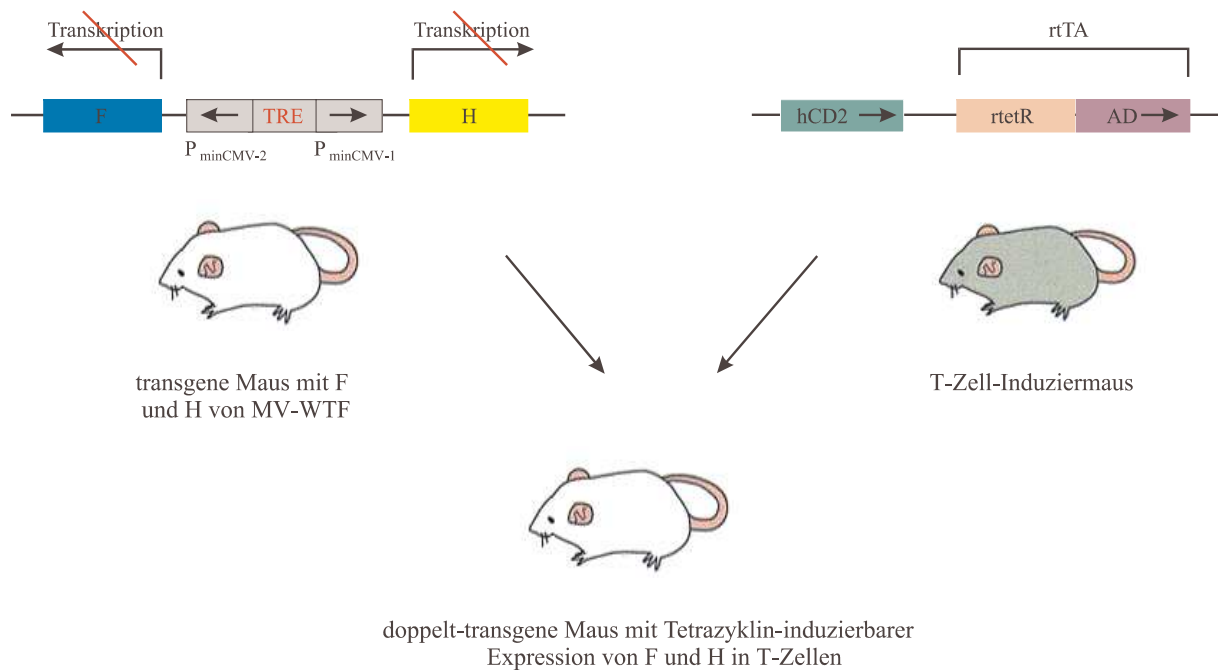


Abbildung 15: Herstellung von doppelt-transgenen Mäusen mit Tetrazyklin-induzierbarer Expression der MV-Glykoproteine F und H in T-Zellen.

Abkürzungen: TRE: Transaktivator-abhängiges Element; $P_{minCMV-1/2}$: Minimalpromotor von Zytomegalievirus; F: Fusionsprotein von MV; H: Hämagglutinin von MV; rtTA: reverser Tetrazyklin-abhängiger Transkriptionsaktivator; hCD2: regulatorisches Element des humanen CD2-Promotors; rtetR: reverser Tetrazyklin-Repressor; AD: Aktivierungsdomäne.

4.1.8 Analyse der Expression von F und H in doppelt-transgenen Mäusen

Da die Herstellung von transgenen Nachkommen der Linie 2 problematisch war und keine homozygote F2-Generation züchtbar war, konnte die Expression von F und H in dieser Linie nicht untersucht werden. In doppelt-transgenen Tieren der Linien 1, 3 und 4 wurde die Transkription und Translation von F und H nach Verabreichung des Tetrazyklinderivats Doxyzyklin untersucht. Dabei konzentrierte man sich auf die Organe Milz und Thymus, da R. Zamoyska zum Nachweis der gewebespezifischen Induktion des regulatorischen Elements des humanen CD2-Promotors zeigte, daß dieses Element in Milz und Thymus aktiviert wird, nicht aber in Leber, Herz und Lunge (Legname et al., 2000).

Es konnte keine Transkription und Translation von F und H in den Linien 1 und 4 ermittelt werden. Die folgenden Daten beziehen sich auf die Linie 3.

Analyse der *in vitro*-Transkription

Um die Doxyzyklin-induzierte Transkription der injizierten DNA *in vitro* nachzuweisen, wurden je 10^7 Milz- und Thymuszellen von zwei doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 in Zellkulturschalen ausplattiert und mit Concavalin A (Con A, 2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) stimuliert. Zu einem parallelen Ansatz wurde zusätzlich Doxyzyklin (2,5 $\mu\text{g}/\text{ml}$) gegeben. Zwei Tage später wurde die Gesamt-RNA isoliert und gereinigt. Nach einer reversen Transkription wurde die entstandene cDNA mit Hilfe der PCR analysiert. Die Transkription von F- und H-mRNA wurde, wie bereits in Kapitel 4.1.6 beschrieben, durch Überprüfung des Spleißens der integrierten Introns untersucht (Abbildung 12). Bei einer Transkription von F-mRNA wurde ein PCR-Produkt von 330 bp erwartet (Oligonukleotide MV39/Intron2), bei einer Transkription von H-mRNA sollte ein PCR-Produkt von 480 bp entstehen (Oligonukleotide H21/Intron1). Im Falle einer fehlenden Transkription war nur die Entstehung eines größeren PCR-Fragments von 0,9 kb bzw. 1 kb möglich. Dieses Fragment konnte aufgrund einer Kontamination der RNA mit genomischer DNA entstehen.

Mit Hilfe der PCR-Analyse konnte die Doxyzyklin-induzierte *in vitro*-Transkription von F- und H-mRNA in sowohl Milz als auch Thymus nachgewiesen werden. Das kleinere PCR-Produkt von 330 bzw. 480 bp entstand ausschließlich bei Doxyzyklin-behandelten Zellen. Abbildung 16 zeigt den Transkriptionsnachweis von H-mRNA (Daten von F-mRNA nicht dargestellt).

Bei der Wiederholung dieses Versuches stellte sich heraus, daß die *in vitro*-Transkription nur bei einer RNA-Isolierung von mindestens 10^7 Zellen nachgewiesen werden konnte. Im Falle von weniger eingesetzten Zellen war der Nachweis von F- und H-mRNA nur über eine sensitivere semi-nested PCR möglich. Dies deutete auf ein geringes Transkriptionsniveau hin.

Analyse der *in vivo*-Transkription

Als nächstes wurde überprüft, ob die Doxyzyklin-induzierte Transkription von F- und H-mRNA auch *in vivo* nachzuweisen war. Doppelt-transgene Mäuse der Linie 3 erhielten Doxyzyklin-enthaltendes Trinkwasser (2 mg Doxyzyklin/ml ddH₂O, 2,5 % Saccharose), das alle zwei Tage gewechselt wurde. An Tag 1, 3, 5 und 8 wurden Thymus und Milz zweier Tiere entnommen. Die Zellen wurden vereinzelt und pro Organ zusammengegeben. Aus je 10^7 Zellen wurde die Gesamt-RNA isoliert, gereinigt und mit Hilfe einer reversen Transkription in cDNA umgeschrieben. Die Transkription von F- und H-mRNA wurde erneut durch PCR-Analyse ermittelt, indem das Spleißen der Introns überprüft wurde (siehe Kapitel 4.1.6).

Auch *in vivo* wurde die Doxyzyklin-induzierte Transkription von F- und H-mRNA nachgewiesen, allerdings nur im Thymus (Abbildung 17). Schon 24 Stunden nach der Gabe des Antibiotikums konnte mRNA im Thymus ermittelt werden. In der

PCR-Analyse der Milzproben wurde nur das größere PCR-Produkt von 0,9 bzw. 1,0 kb nachgewiesen (Daten nicht dargestellt).

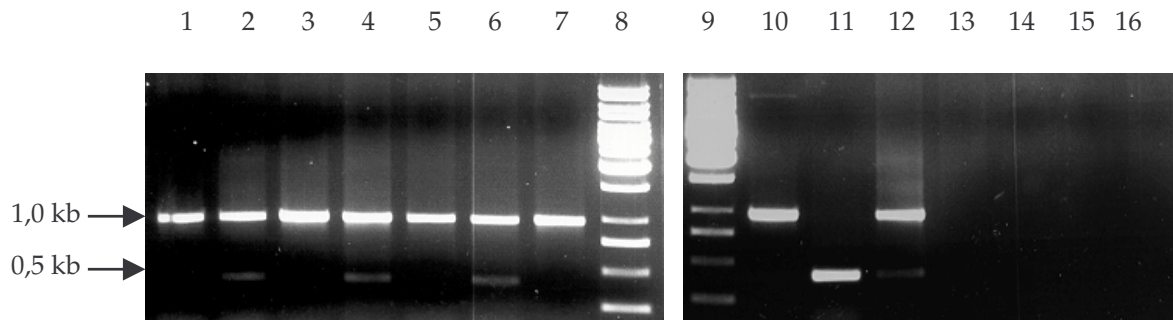


Abbildung 16: Analyse der Doxyzyklin-induzierten *in vitro*-Transkription von *H*-mRNA in Milz und Thymus von doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 mittels PCR. Die Oligonukleotide H21 und Intron1 ergaben die erwartete Produktgröße von 1 kb (fehlende Transkription) bzw. 480 bp (Transkription von *H*-mRNA).

- Spur 1-4: cDNA von Milz- bzw. Thymuszellen einer doppelt-transgenen Maus (Linie 3)
- Spur 5-7/12: cDNA von Milz- bzw. Thymuszellen einer weiteren doppelt-transgenen Maus (Linie 3)
- Spur 13-16: cDNA von Milz- bzw. Thymuszellen einer C57BL/6-Maus

- Spur 1: cDNA von Milzzellen, Zugabe von ConA
- Spur 2: cDNA von Milzzellen, Zugabe von ConA/Doxyzyklin
- Spur 3: cDNA von Thymuszellen, Zugabe von ConA
- Spur 4: cDNA von Thymuszellen, Zugabe von ConA/Doxyzyklin
- Spur 5: cDNA von Milzzellen, Zugabe von ConA
- Spur 6: cDNA von Milzzellen, Zugabe von ConA/Doxyzyklin
- Spur 7: cDNA von Thymuszellen, Zugabe von ConA
- Spur 8: 1 kb-Marker
- Spur 9: 1 kb-Marker
- Spur 10: Positivkontrolle, Plasmid pBI4_liFiH6
- Spur 11: Positivkontrolle, cDNA von transient transfizierten HeLa rtTA-Zellen mit pBI4_liFiH6
- Spur 12: cDNA von Thymuszellen, Zugabe von ConA/Doxyzyklin
- Spur 13: Negativkontrolle, cDNA von Milzzellen, Zugabe von ConA
- Spur 14: Negativkontrolle, cDNA von Milzzellen, Zugabe von ConA/Doxyzyklin
- Spur 15: Negativkontrolle, cDNA von Thymuszellen, Zugabe von ConA
- Spur 16: Negativkontrolle, cDNA von Thymuszellen, Zugabe von ConA/Doxyzyklin

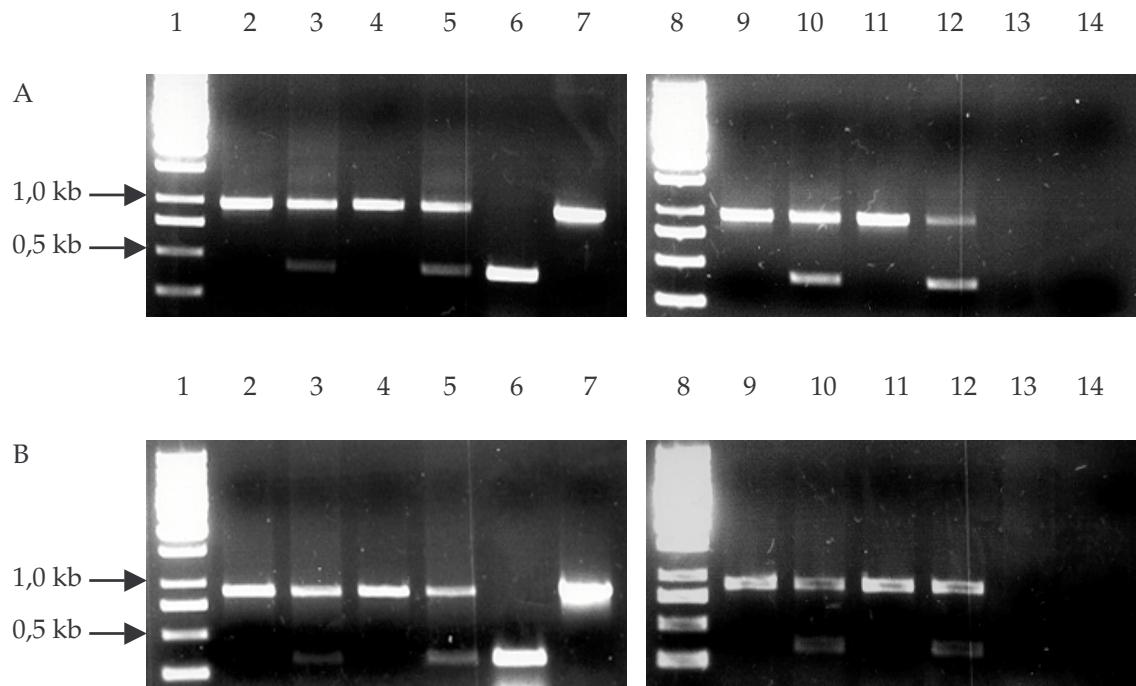


Abbildung 17: Analyse der Doxyzyklin-induzierten *in vivo*-Transkription von H- und F-mRNA im Thymus von doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 mittels PCR.

A: Es wurden die Oligonukleotide H21 und Intron1 verwendet, die erwartete Produktgröße betrug 1 kb (fehlende Transkription) bzw. 480 bp (Transkription von H-mRNA).

B: Es wurden die Oligonukleotide MV39 und Intron2 gewählt, die erwartete Produktgröße betrug 0,9 kb (fehlende Transkription) bzw. 330 bp (Transkription von F-mRNA).

Spur 2-5, 9-12: cDNA von Thymozyten zweier doppelt-transgener Mäuse der Linie 3

- Spur 1: 1 kb-Marker
- Spur 2: ohne Doxyzyklin-Behandlung
- Spur 3: nach 1 Tag Doxyzyklin-Behandlung
- Spur 4: ohne Doxyzyklin-Behandlung
- Spur 5: nach 3 Tagen Doxyzyklin-Behandlung
- Spur 6: Positivkontrolle, cDNA von transient transfizierten HeLa rtTA-Zellen mit pBI4_liFiH6
- Spur 7: Positivkontrolle, Plasmid pBI4_liFiH6
- Spur 8: 1 kb-Marker
- Spur 9: ohne Doxyzyklin-Behandlung
- Spur 10: nach 5 Tagen Doxyzyklin-Behandlung
- Spur 11: ohne Doxyzyklin-Behandlung
- Spur 12: nach 8 Tagen Doxyzyklin-Behandlung
- Spur 13: Negativkontrolle, cDNA einer C57BL/6-Maus
- Spur 14: Negativkontrolle, ddH₂O

Bei einer leicht veränderten Wiederholung dieses Versuchsansatzes konnte die Transkription im Thymus weniger eindeutig nachgewiesen werden. Es wurden täglich 0,5 mg Doxyzyklin i. p. injiziert. An Tag 3, 5 und 7 wurde die Transkription in zwei doppelt-transgenen Tieren analysiert. In der Milz konnte erneut keine Transkription nachgewiesen werden, manche Thymusproben enthielten geringe Mengen an F- und H-mRNA (Daten nicht dargestellt). Dies war ein weiterer Hinweis für ein geringes Transkriptionsniveau.

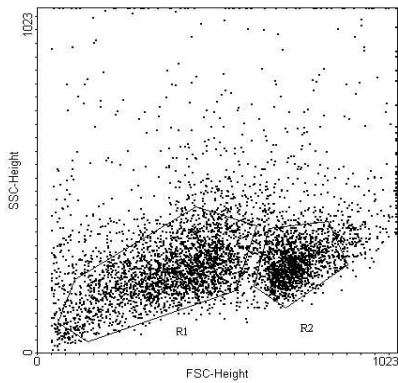
Analyse der Translation

Nachdem gezeigt wurde, daß in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* F- und H-mRNA nach Doxyzyklin-Verabreichung transkribiert wurde, war die Frage zu klären, ob auch die entsprechenden Proteine nachgewiesen werden konnten.

Um dies zu untersuchen, wurde zwei doppelt-transgenen Tieren täglich 1 mg des Antibiotikums i. p. injiziert. Nach 7 Tagen wurden die Milz- und Thymuszellen vereinzelt und pro Tier und Organ je 5×10^7 Zellen in eine Zellkulturflasche gegeben. Es wurden 2 µg/ml Doxyzyklin zugegeben, die Milzzellen wurden zusätzlich mit 2,5 µg/ml ConA stimuliert. Nach 2 Tagen wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen das MHC I-Molekül (H-2Ld/H-2Db) und das Hämagglutinin von MV (L77) gefärbt und mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Durch die MHC I-Färbung wurden die intakten Zellen ermittelt, da dieses Molekül von allen kernhaltigen eukaryotischen Zellen exprimiert wird. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem humanen anti-MV-Serum (enthält Antikörper gegen H, F und N von MV) bzw. einem humanen Negativ-Serum ohne MV-spezifischen Antikörper gefärbt.

Die Morphologie von L77/FITC-gefärbten Maus-Thymozyten (C57BL/6 bzw. doppelt-transgene Maus der Linie 3) ist in Abbildung 18 abgebildet. Sie wird über das Vorwärtsstreulicht (FSC, Zellgröße) und das Seitwärtsstreulicht (SSC, Zellgranularität) dargestellt. Es sind jeweils zwei Zellpopulationen sichtbar. Region 2 bzw. 4 definiert morphologisch intakte Thymozyten, charakterisiert durch eine in Abbildung 19.B und 20.B dargestellte starke MHC I-Expression (Fluoreszenz FL1 aufgetragen gegen die Ereignisse, Events). Das dunkle Färbeprofil spiegelt die Negativkontrolle wieder (Färbung mit FITC-gekoppeltem Zweitantikörper). Region 1 bzw. 3 definiert morphologisch nicht intakte Thymozyten. Der Hauptbestandteil dieser Region besteht aus unreifen Thymozyten, charakterisiert durch eine geringere MHC I-Expression (Abbildung 19.A und 20.A).

A



B

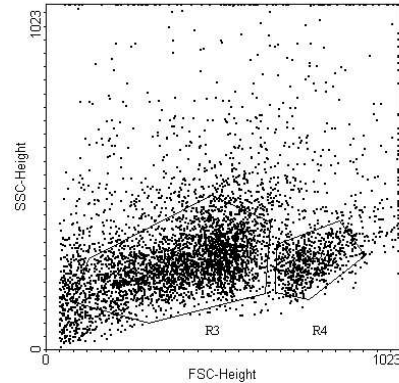


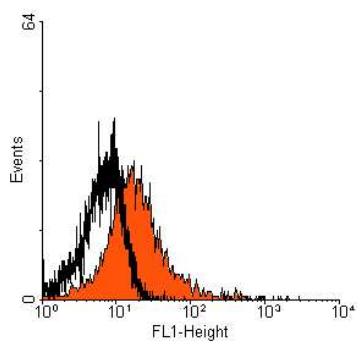
Abbildung 18: Morphologie von Thymozyten der Maus mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Färbung mit L77 und FITC-gekoppeltem Zweitantikörper).

A: C57BL/6-Maus

B: doppelt-transgene Maus der Linie 3, i. p. Injektion von 1 mg Doxzyzyklin (7 Tage)

Abkürzungen: R: Region; FSC: Vorwärtsstreulicht, Zellgröße ; SSC: Seitwärtsstreulicht, Zellgranularität.

A



B

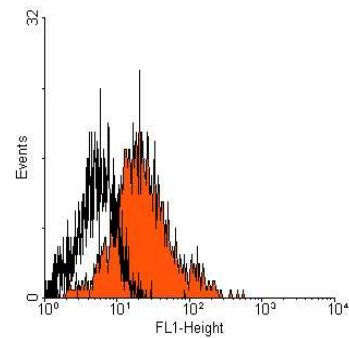


Abbildung 19: MHC I-Expression in Thymozyten einer C57BL/6-Maus mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Färbung mit H-2Ld/H-2Db und FITC-gekoppeltem Zweitantikörper). Das helle Färbeprofil stellt die Negativkontrolle dar (Färbung mit FITC-gekoppeltem Zweitantikörper).

A: Morphologisch nicht intakte Thymozyten (Region 1 von Abbildung 18.A)

B: Morphologisch intakte Thymozyten (Region 2 von Abbildung 18.A)

Abkürzungen: FL1: Fluoreszenz 1.

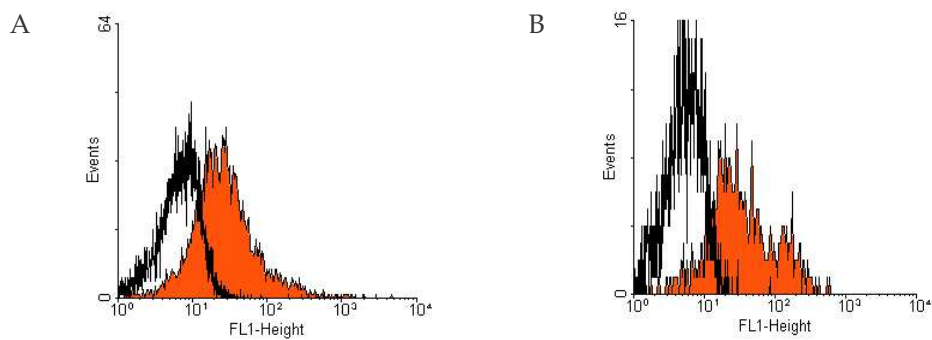


Abbildung 20: MHC I-Expression in Thymozyten einer doppelt-transgenen Maus der Linie 3 nach *i. p.* Injektion von 1 mg Doxyzyklin (7 Tage), mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Färbung mit H-2Ld/H-2Db und FITC-gekoppeltem Zweitantikörper). Das helle Färbeprofil stellt die Negativkontrolle dar (Färbung mit FITC-gekoppeltem Zweitantikörper).

A: Morphologisch nicht intakte Thymozyten (Region 3 von Abbildung 18.B)

B: Morphologisch intakte Thymozyten (Region 4 von Abbildung 18.B)

Abkürzungen: FL1: Fluoreszenz 1.

Die Thymozyten der Region 2 bzw. 4 wurden auf Expression von F und H geprüft. Abbildung 21 zeigt diese L77/FITC-gefärbte Zellpopulation (FL1), aufgetragen gegen die Zellgröße (FSC). Beim Vergleich mit einer C57BL/6-Maus (21.A) war bei einer der beiden Doxyzyklin-injizierten doppelt-transgenen Mäusen (21.B) eine Verschiebung der Zellpopulation des rechten oberen Quadranten um 20 % meßbar. Somit wurde eine schwache Expression des MV-Glykoproteins Hämagglutinin im Thymus einer doppelt-transgenen Maus der Linie 3 nachgewiesen.

Eine Expression von MV-Proteinen in der Milz konnte nicht nachgewiesen werden. Das Färbeprofil des humanen anti-MV-Serums zeigte weder bei Milz noch bei Thymus eine Expression von MV-Proteinen (Daten nicht dargestellt).

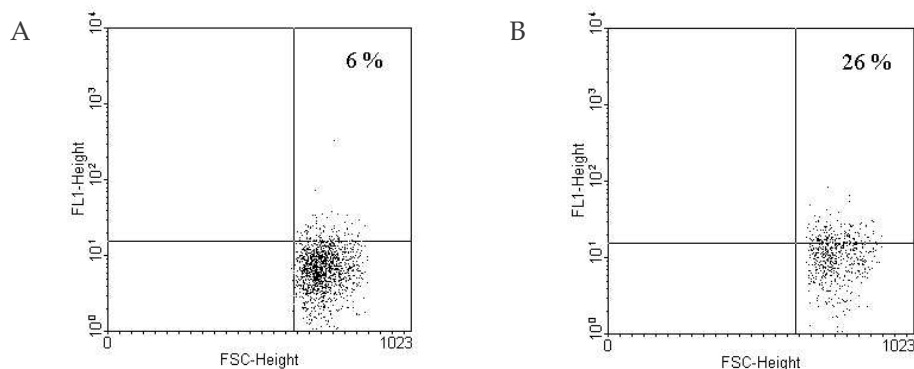


Abbildung 21: Nachweis von H-Protein im Thymus einer doppelt-transgenen Maus der Linie 3 nach *i. p.* Injektion von 1 mg Doxyzyklin (7 Tage), mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Färbung mit L77 und FITC-gekoppeltem Zweitantikörper).

A: C57BL/6-Maus: im rechten oberen Quadranten befinden sich 6 % der Zellen der Region 2 aus Abbildung 18.A

B: doppelt-transgene Maus der Linie 3: im rechten oberen Quadranten befinden sich 26 % der Zellen der Region 4 aus Abbildung 18.B

Abkürzungen: FL1: Fluoreszenz 1; FSC: Vorwärtsstreulicht, Zellgröße.

Zur weiteren Charakterisierung der Thymozyten des bereits beschriebenen Experiments (Kapitel 4.1.8), in denen die Transkription von sowohl F- als auch H-mRNA nachgewiesen werden konnte, wurden diese ebenfalls mit monoklonalen Antikörpern gegen MV-Glykoproteine gefärbt und mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Es konnte keine Expression der MV-Proteine gezeigt werden (Daten nicht dargestellt).

Von insgesamt 11 Doxyzyklin-verabreichten doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3, konnte in einem Tier eine schwache Expression von H-Protein im Thymus nachgewiesen werden (Abbildung 21). Dieser Expressionsnachweis stellte somit ein Einzelergebnis dar und war nicht reproduzierbar.

Die Analysen der Transkription und Translation zeigten eindeutig, daß die Expression von F und H in den doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 auf sehr niedrigem Niveau stattfand.

4.1.9 Zusammenfassung der transgenen Mauslinien 1, 2, 3 und 4

In Tabelle 6 ist eine Zusammenfassung der Mauslinien 1-4 dargestellt.

Genotyp und Expressionsanalyse	Linie 2	Linie 1	Linie 4	Linie 3
Integration des injizierten Fragments	multiple-copy	multiple-copy	multiple-copy	single-copy
Kopieanordnung	tandemartig	tandemartig	tandemartig	einzelne Kopie
Kopieanzahl pro haploidem Genom	ca. 10	ca. 10	ca. 10	1
Herstellung der homozygoten Linien	nicht möglich, da nicht züchtbar	ja	ja	ja
Leakiness	nicht leaky	nicht leaky	nicht leaky	nicht leaky
Herstellung der doppelt-transgenen Mäuse	nicht möglich, da nicht züchtbar	ja	ja	ja
Dox-induzierbare Transkription (doppelt-transgene Mäuse)	Analyse nicht möglich, da nicht züchtbar	keine Transkription von F- und H-mRNA in Milz und Thymus	keine Transkription von F- und H-mRNA in Milz und Thymus	Transkription von F- und H-mRNA in Milz (<i>in vitro</i>) und Thymus (<i>in vitro</i> und <i>in vivo</i>)
Dox-induzierbare Translation (doppelt-transgene Mäuse)	Analyse nicht möglich, da nicht züchtbar	keine Translation von F und H in Milz und Thymus	keine Translation von F und H in Milz und Thymus	schwache Translation von H im Thymus

Tabelle 6: Zusammenfassung der transgenen Mauslinien 1, 2, 3 und 4.

Abkürzungen: Dox: Doxyzyklin; F: Fusionsprotein von Masernvirus; H: Hämagglutinin von Masernvirus.

4.1.10 Auswirkungen der Expression von F und H in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3

4.1.10.1 Kinetik der Thymozytenanzahl

In vitro-Studien haben gezeigt, daß humane Zellen, die F und H des Masernvirus auf ihrer Oberfläche exprimieren, fusionieren wodurch der Zelltod induziert wird. Eine stabile Transfektion von HeLa rtTA-Zellen mit dem Vektor pBI4_liFiH6 war nicht möglich (eigene unveröffentlichte Daten; Daten von Andrew Davidson). Es wurde ebenfalls gezeigt, daß Nagetierzellen bei einer stabilen Transfektion von F und H sterben (unveröffentlichte Daten). Dies sind Hinweise auf einen möglichen toxischen Effekt der stabilen F- und H-Expression auf Nagetierzellen, aufgrund einer ausgelösten Zellfusion. Aus diesem Grund wurde überprüft, ob eine schwache Expression von F und H in dem neuen Mausmodell eine Zerstörung der Thymozyten bewirkte. Dies wurde mit Hilfe einer Kinetikanalyse der Thymozytenanzahl nach Verabreichung von Doxyzyklin untersucht.

Doppelt-transgenen Mäusen wurde Doxyzyklin-haltiges Trinkwasser verabreicht (2 mg Doxyzyklin/ml ddH₂O, 2,5 % Saccharose). Alle zwei Tage wurde das Trinkwasser gewechselt. An Tag 1, 3 und 5 wurde der Thymus zweier Tiere bzw. an Tag 8 der Thymus eines Tieres entnommen. Die Zellen wurden vereinzelt und pro Organ zweimal gezählt. Als Kontrolle dienten Antibiotika-unbehandelte doppelt-transgene Mäuse. Tabelle 7 zeigt die Kinetik der Thymozytenanzahl. Diese Daten zeigen eindeutig, daß die Anzahl der Thymozyten durch eine schwache Expression von F und H bzw. durch Verabreichung von Doxyzyklin nicht beeinflusst wurde. Ein Zelltod konnte nicht nachgewiesen werden.

Dauer der Antibiotika-Behandlung	doppelt-transgene Mäuse (Anzahl der Zellen x10 ⁷)			
	mit Dox-Behandlung		ohne Dox-Behandlung	
	Tier 1	Tier 2	Tier 1	Tier 2
1 Tag	17,5 +/- 0,7	16,5 +/- 3,5	20 +/- 1,4	18,5 +/- 3,5
3 Tage	5,3 +/- 0,28	9,2 +/- 0,28	7,75 +/- 1,77	5,2 +/- 0,99
5 Tage	12,5 +/- 0,7	9,5 +/- 3,5	9,2 +/- 0,14	8 +/- 0,56
8 Tage	16 +/- 2,8		18 +/- 1,4	

Tabelle 7: Kinetik der Thymozytenanzahl von doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 nach Verabreichung von Doxyzyklin-haltigem Trinkwasser. Alle Angaben sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung.

Abkürzungen: Dox: Doxyzyklin

In allen Thymi dieser Doxyzyklin-behandelten Tiere wurde F- und H-mRNA nachgewiesen (Daten in Kapitel 4.1.8 dargestellt). An Tag 3, 5 und 8 wurden die Thymozyten mit monoklonalen Antikörpern gegen F und H von MV gefärbt und mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Es konnte kein Protein nachgewiesen werden. Vermutlich war dies der Grund dafür, daß die Thymozytenanzahl durch Doxyzyklin-Behandlung nicht beeinflußt wurde.

4.1.10.2 Analyse der Masernvirus-spezifischen Immunantwort

Nachdem gezeigt wurde, daß in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 Doxyzyklin-Verabreichung zu einer schwachen Produktion von Hämagglutinin im Thymus einer einzigen Maus führte, wurde als nächstes die Masernvirus-spezifische T-Zell- und Antikörperantwort als immunologischer Nachweis einer Expression der MV-Glykoproteine untersucht.

Analyse der Masernvirus-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort

Die Bildung einer MV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort wurde mit Hilfe eines Proliferationstests untersucht. Für diesen Zweck wurden 4 doppelt-transgenen Mäusen an den Tagen 1-6 Doxyzyklin-haltiges Trinkwasser verabreicht (2 mg Doxyzyklin/ml ddH₂O, 2,5 % Saccharose). Als Positivkontrolle dienten 3 doppelt-transgene Tiere, denen an Tag 1 MV-Edmonston (10⁶) i. p. injiziert wurde. Zusätzlich wurden 2 Gruppen mit je 4 unbehandelten doppelt-transgenen Mäusen bzw. 4 unbehandelten C57BL/6-Mäusen gebildet.

An Tag 15 wurden die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen mit UV-inaktiviertem MV-Antigen stimuliert. Dieses Antigen wurde zuvor an die Zellkulturplatte gebunden (10 µg/ml). Zur Überprüfung der Zellviabilität wurde eine Stimulation mit ConA (2,5 µg/ml) durchgeführt.

Alle Tiere zeigten eine ConA-stimulierte Zellproliferation (Stimulationsindex > 2). Eine schwache Antigen-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort wird gewöhnlich durch einen Stimulationsindex (SI) von 2 bis 4 definiert. Der Schwellenwert von 2 wurde für diesen Versuch auf 2,2 angehoben, da eine unbehandelte doppelt-transgene Maus einen SI von 2,1 aufwies (Tabelle 8). Von den vier Doxyzyklin-verabreichten doppelt-transgenen Mäusen zeigte ein Tier, durch einen SI von 3,7, eine schwache T-Zellproliferation (gekennzeichnet mit *). Alle anderen Mäuse hatten, bis auf die drei Tiere der Positivkontrolle, einen SI von < 2,2. Folglich konnte ein minimaler Unterschied in der T-Zellproliferation zwischen den Doxyzyklin-verabreichten doppelt-transgenen Mäusen und den unbehandelten transgenen Tieren bzw. C57BL/6-Mäusen gezeigt werden. Es entstand eine schwache MV-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort in einer der vier doppelt-transgenen Mäuse.

Versuchstiere und Behandlung	SI (MV-Antigen)	SI (ConA)
Negativkontrolle doppelt-transgene Mäuse, unbehandelt	0,7	4,4
	2,1	2,8
	1,6	6,7
	0,4	2,5
doppelt-transgene Mäuse, Doxyzyklin-Verabreichung (2 mg/ml, Tag 1-6)	2,0	11,4
	3,7 *	5,9
	1,5	2,6
	1,2	3,8
Positivkontrolle doppelt-transgene Mäuse, MV- Edmonston i. p. (10^6 , Tag 1)	2,8 *	9,1
	2,9 *	2,3
	2,7 *	4,0
Negativkontrolle C57BL/6-Mäuse, unbehandelt	1,4	10,8
	0,8	2,2
	1,8	13,3
	1,7	13,5

Tabelle 8: *Analyse der MV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 mit Hilfe eines Proliferationstests (Tag 15).*

*: *Stimulationsindex (SI) liegt zwischen 2,2 und 4 und beweist dadurch eine schwache MV-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort.*

Analyse der Masernvirus-spezifischen B-Zellantwort

Anschließend wurde die MV-spezifische B-Zellantwort untersucht. Fünf doppelt-transgene Mäuse erhielten 30 Tage lang Doxyzyklin-haltiges Trinkwasser (2 mg Doxyzyklin/ml ddH₂O, 2,5 % Saccharose). Als Positivkontrolle dienten 4 doppelt-transgene Tiere, denen an Tag 1 MV-Edmonston (10^6) i. p. injiziert wurde. Zusätzlich wurden 5 unbehandelte doppelt-transgene Mäuse als Negativkontrolle eingesetzt.

Um die Produktion von MV-spezifischen Antikörper zu untersuchen, wurden an Tag 31 Seren der Mäuse entnommen und im ELISA untersucht. Eine der fünf Doxyzyklin-verabreichten doppelt-transgenen Mäuse produzierte eine geringe Menge an MV-spezifischen Antikörpern (gekennzeichnet mit *), definiert durch einen doppelten ELISA-Wert des nativen C57BL/6-Mäuseserums. Deshalb wurde der Schwellenwert in diesem Versuch auf 0,462 gesetzt. In Tabelle 9 sind die gemessenen optischen Dichten des ELISAs dargestellt.

Versuchstiere und Behandlung	optische Dichte _{492 nm}	
	Mittelwerte zweier Messungen	Mittelwert pro Gruppe
doppelt-transgene Mäuse, Doxyzyklin-Verabreichung (2 mg/ml, Tag 1-31)	0,129	0,287
	0,224	
	0,259	
	0,476 *	
	0,348	
Positivkontrolle doppelt-transgene Mäuse, MV-Edmonston i. p. (10 ⁶ , Tag 1)	1,264	> 2,1
	**	
	**	
	**	
Negativkontrolle doppelt-transgene Mäuse, unbehandelt	0,284	0,220
	0,344	
	0,211	
	0,127	
	0,132	
Negativkontrolle native C57BL6-Maus	0,231	0,231
Positivkontrolle Antikörper L77 (10 µg/ml)	**	**

Tabelle 9: Analyse der MV-spezifischen B-Zellantwort in doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 (Tag 31) mit Hilfe eines ELISAs.

*: Erklärung im Text enthalten

** : Optische Dichte liegt über der Nachweisgrenze von 2,5

4.1.10.3 Analyse der Induktion einer Immunsuppression

Die ausgeprägte Immunsuppression während der MV-Infektion erhöht die Empfänglichkeit von Kindern für opportunistische Infektionen. In der zweiten bis vierten Woche nach Infektion ist die Proliferation von peripheren Blutlymphozyten (*ex vivo*) nach Stimulation mit Mitogenen und Antigenen herabgesetzt (Griffin, 1995). Es konnte *in vitro* und *in vivo* gezeigt werden, daß die beiden MV-Glykoproteine F und H diese Proliferationshemmung induzieren (Schlender et al., 1996; Niewiesk et al., 1997 a).

Aus diesem Grund ergab sich die Frage, ob in dem neuen Mausmodell eine Immunsuppression durch Doxyzyklin-Verabreichung induziert werden konnte. Bei

erfolgreicher Induktion kann das neue Mausmodell zur Analyse der MV-induzierten Immunsuppression eingesetzt werden.

Die Auslösung einer Immunsuppression wurde mit Hilfe eines Proliferationstests untersucht. Dazu wurden zwei doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 täglich 1 mg Doxyzyklin i. p. injiziert (7 Tage). An Tag 8 wurden die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen mit ConA (2,5 µg/ml) stimuliert. Um die F- und H-Expression *in vitro* aufrecht zu erhalten, wurde in parallelen Ansätzen Doxyzyklin (2 µg/ml) bzw. Doxyzyklin und ConA zugegeben.

Es konnte keine Immunsuppression in den doppelt-transgenen Mäusen festgestellt werden. Sowohl die unbehandelten Tiere, als auch die Doxyzyklin-behandelten Tiere zeigten eine starke T-Zellproliferation, definiert durch einen Stimulationsindex (SI) > 4 (Tabelle 10). Die *in vitro*-Zugabe von Doxyzyklin reduzierte den SI bei allen Tieren, mit Ausnahme einer Maus (gekennzeichnet mit *).

Versuchstiere und Behandlung	SI	SI (Dox-Zugabe <i>in vitro</i>)
doppelt-transgene Mäuse, 1 mg Dox i. p. (7 Tage)	65,3	50
	41,9	36,3
Negativkontrolle C57BL/6-Maus, unbeh.	61,4	42
Negativkontrolle , doppelt- transgene Mäuse, unbeh.	190,9	141,6
	34,6 *	89,2 *

Tabelle 10: Analyse der Induktion einer Immunsuppression mit Hilfe eines Proliferationstests (Tag 8).

Abkürzungen: SI: Stimulationsindex; Dox: Doxyzyklin; i. p.: intraperitoneal; unbeh.: unbehandelt; *: Erklärung im Text enthalten.

Die Ergebnisse des vorletzten Experiments (Kapitel 4.1.10.2) bestätigten die fehlende induzierte Immunsuppression in Doxyzyklin-behandelten doppelt-transgenen Mäusen. Die T-Zellproliferation zeigte keine systematischen Unterschiede, nur interindividuelle Variation.

4.1.10.4 Infektion mit „Friend Virus“ während Langzeit-F/H-Expression

C57BL/6-Mäuse sind resistent gegen die Induktion eines Milztumors nach Infektion mit „Friend Virus“ (FV). Es entsteht zwar eine persistierende FV-Infektion, aber es entwickelt sich kein Milztumor. Die Ursache dafür sind die genetischen Resistenzfaktoren H-2^b (Chesebro et al., 1974) und Fv-2 (Persons et al., 1999). Durch Depletion der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen werden diese Tiere empfänglich für FV-Infektionen und entwickeln 6-11 bzw. 6-8 Wochen nach FV-Infektion einen Milztumor (Hasenkrug, 1999).

In dem neuen transgenen Mausmodell wurde eine Langzeit-F/H-Expression induziert, damit auch geringe immunsuppressive Effekte kumulativ über die Zeit sichtbar gemacht werden konnten.

Drei doppelt-transgene Mäuse erhielten 23 Wochen Doxyzyklin-haltiges Trinkwasser (2 mg Doxyzyklin/ml ddH₂O, 2,5 % Saccharose). In den ersten 4 Wochen wurde ihnen zusätzlich 3 mal pro Woche 1 mg Doxyzyklin i. p. injiziert. Nach einer Woche Antibiotika-Behandlung wurden sie mit 9.000 SFFU („spleen focus-forming units“) FV-B intravenös infiziert. Als Negativkontrolle dienten drei weitere infizierte doppelt-transgene Mäuse ohne Antibiotika-Verabreichung. Zweimal pro Woche wurden die Milzen palpirt, es wurde jedoch keine Vergrößerung der Milz festgestellt. Im Gegensatz dazu wurde bei den Antibiotika-behandelten Tieren eine starke Vergrößerung der Leber getastet.

22 Wochen nach der Infektion wurde der Versuch abgebrochen und die Größe von Leber und Milz analysiert. Die Milzen der Doxyzyklin-verabreichten Mäuse waren leicht vergrößert und signifikant schwerer ($p < 0,0029$), als die Milzen der Kontrolltiere (Tabelle 11). Aus den Milzen der infizierten Mäuse ließ sich kein infektiöses Virus rückisolieren.

doppelt-transgene Mäuse (FV-B-Infektion)	Milzgewicht (mg)	Mittelwert pro Gruppe (mg) +/- SD
Negativkontrolle keine Dox- Behandlung	119	124,3 +/- 3,86
	126	
	128	
Dox- Behandlung (23 Wochen)	145	151 +/- 4,32 $p < 0,0029$
	155	
	153	

Tabelle 11: Analyse der Milzgewichte, 22 Wochen nach Infektion von doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 mit FV-B (9.000 SFFU i. v.). Der Unterschied der Milzgewichte ist statistisch signifikant ($p < 0,0029$). Die Milzvergrößerungen sind wahrscheinlich auf die Leberdegeneration zurückzuführen.
Abkürzungen: Dox: Doxyzyklin; FV: Friend Virus; p: statistische Wahrscheinlichkeit; SD: Standardabweichung.

Die Lebern der Antibiotika-behandelten Tiere waren stark deformiert bzw. verfettet. Um eine Expression von F und H von MV in der Leber als Ursache dieser organischen Veränderung auszuschließen, wurde die Transkription von F- und H-mRNA in Hepatozyten von doppelt-transgenen Mäusen der Linie 3 analysiert.

Nach Verabreichung von Antibiotika-enthaltendem Trinkwasser (2 mg Doxyzyklin/ml ddH₂O, 2,5 % Saccharose) über einen Zeitraum von einer Woche wurden die Lymphozyten aus der Leber von vier doppelt-transgenen Mäusen gespült. Aus je 10⁷ Hepatozyten wurde die Gesamt-RNA isoliert und in cDNA umgeschrieben. Mit Hilfe der PCR und den Oligonukleotiden H21/Intron1 bzw. MV39/Intron2 wurde nachgewiesen, daß keine F- und H-mRNA in der Leber transkribiert wurde (Daten nicht dargestellt). Aus diesem Grund war die Leberdeformation auf eine Überdosierung von Doxyzyklin zurückzuführen, dies hatte wahrscheinlich eine leichte Milzvergrößerung zur Folge. Leberschädigungen und fettige Degenerationen der Leber aufgrund einer Überdosierung von Doxyzyklin sind bereits in der Literatur beschrieben (Forth et al., 1987). Demzufolge wurden die doppelt-transgenen Mäuse durch Langzeit-Expression der MV-Glykoproteine nicht empfänglich für FV-Infektion. Es wurden keine geringen immunsuppressiven Effekte kumulativ über die Zeit sichtbar.

4.2 Etablierung eines Modelles der Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp in der Baumwollratte und Suppression durch MV-Infektion

Ein Zeichen für die MV-induzierte Immunsuppression im Menschen ist die Hemmung der Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp (=DTH-Reaktion, delayed type hypersensitivity) gegen Tuberkulin (Pirquet, 1908; Fireman et al., 1969). Das in Mäusen etablierte kutane Hypersensitivitätsmodell mit Dinitrofluorobenzol (DNFB) sollte im Rahmen dieser Arbeit im Baumwollrattensystem aufgebaut werden, damit mit Hilfe dieses Modells der Einfluß von MV auf DTH-Reaktionen untersucht werden konnte.

4.2.1 Charakterisierung der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im DTH-Modell

4.2.1.1 Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen während der primären DTH-Antwort

DNFB ist ein Hapten, welches nach Bindung an schwefelhaltige Proteine als starkes T-Zellantigen wirkt. Nach Applikation auf die Haut von Mäusen wird eine primäre und sekundäre DTH-Antwort ausgelöst. Zur Induktion einer primären DTH-Antwort wird DNFB auf die Ohrhaut appliziert und durch dendritische Zellen aufgenommen. Diese wandern zu den drainierenden Lymphknoten, präsentieren dort das Antigen und stimulieren somit die Proliferation von DNFB-spezifischen T-Zellen.

In ruhenden Lymphknoten beträgt das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen etwa 2:1. Nach Auftragung von DNFB auf die Haut der Mäuse und einer dadurch ausgelösten primären DTH-Antwort, verschiebt sich dieses Verhältnis in Richtung CD8⁺ T-Zellen und beträgt ca. 1:2. Es wurde analysiert, ob die DNFB-induzierte Verschiebung der T-Zellzusammensetzung in Richtung CD8⁺ T-Zellen auch im Baumwollrattenmodell stattfindet. Dies war nur durch die Entwicklung von zwei neuen monoklonalen Antikörpern möglich, die spezifisch für die CD4- und CD8-Moleküle der Baumwollratte sind. Der CD4-spezifische Antikörper CR-CD4 wurde durch Immunisierung von BALB/c-Mäusen mit Concanavalin A-stimulierten Baumwollrattenmilzzellen von Karen Pueschel hergestellt. Der CD8-spezifische Antikörper CR-CD8 wurde von Annette Tietz durch Immunisierung mit L929-Zellen (Mausfibroblasten) hergestellt, die zuvor mit dem CD8- α -Gen von Baumwollratten transfiziert wurden.

Nach Verabreichung von 40 μ l einer 2 %-igen DNFB-Lösung auf des rechte Ohr von Baumwollratten an 3 aufeinanderfolgenden Tagen, wurden die drainierenden Ohrlymphknoten entfernt und die Zellen vereinzelt. Die Zellen wurden auf einen Objektträger zentrifugiert und nach Pappenheim (May-Grünwald/Giemsa)

angefärbt. Die Lymphknotenzellen wurden im Mikroskop als Lymphozyten identifiziert. Im Gegensatz zum Maussystem wurde keine Einwanderung von Granulozyten durch DNFB-Stimulation beobachtet. Die Anzahl der Lymphozyten war in den DNFB-behandelten Ohrlymphknoten 5-mal höher, als im unbehandelten linken Ohr. Dies deutete auf eine DNFB-stimulierte Einwanderung von Lymphozyten hin.

Als nächstes wurde das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen analysiert. Dafür wurden an 3 aufeinander folgenden Tagen je 40 µl einer 2 %-igen DNFB-Lösung auf das rechte Ohr von fünf Baumwollratten aufgetragen. Am nächsten Tag wurden die drainierenden Ohrlymphknoten beider Ohren entfernt. Die Zellen wurden vereinzelt, mit den Antikörpern CR-CD4 bzw. CR-CD8 angefärbt und mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Zusätzlich wurden die Zellen mit dem Antikörper W6/32 gefärbt, welcher das MHC I-Molekül der Baumwollratte erkennt (Dissertation von Karen Pueschel, 2001).

Die Morphologie von FITC-gefärbten Baumwollrattenlymphozyten (nicht-behandelt bzw. DNFB-behandelt) ist in Abbildung 22 gezeigt. Sie wird über die Zellgröße (FSC, Vorwärtsstreulicht) und die Zellgranularität (SSC, Seitwärtsstreulicht) dargestellt. Es sind jeweils zwei Zellpopulationen sichtbar. Die Population der größeren Zellen besteht aus aktivierten Blasten. Die Anzahl dieser aktivierten Zellen steigt durch DNFB-Stimulation deutlich an (Abbildung 22.B). Morphologisch intakte Lymphozyten exprimieren das MHC I-Molekül. Von den in Abbildung 22 eingesetzten Lymphozyten exprimierten nahezu 100 % der Zellen dieses Molekül (Daten nicht gezeigt).

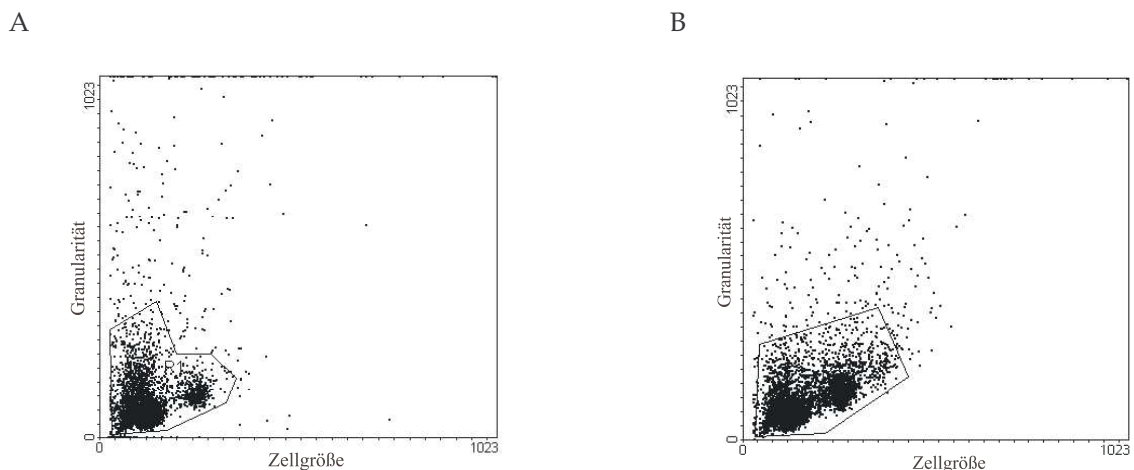


Abbildung 22: Morphologie von Baumwollrattenlymphozyten der drainierenden Ohrlymphknoten mit Hilfe der Durchflußzytometrie (Färbung mit FITC-gekoppeltem Zweitantikörper). A: DNFB-unbehandelte Lymphozyten des linken Ohres; B: DNFB-behandelte Lymphozyten des rechten Ohres

Diese Lymphozyten wurden auf Expression des CD4- bzw. CD8-Moleküls geprüft. Abbildungen 23 und 24 zeigen die relative Expression von Zellen, die mit Antikörpern gegen CD4 oder CD8 gefärbt worden waren, aufgetragen gegen die Zellzahl (Events). Das Verhältnis der in Abbildung 23 gezeigten unstimulierten CD4⁺ T-Zellen zu CD8⁺ T-Zellen betrug annähernd 2:1. Die Zusammensetzung der T-Zellen wurde durch DNFB-Stimulation in Richtung CD8⁺ T-Zellen verschoben, das Verhältnis betrug annähernd 1:1,9 (Abbildung 24).

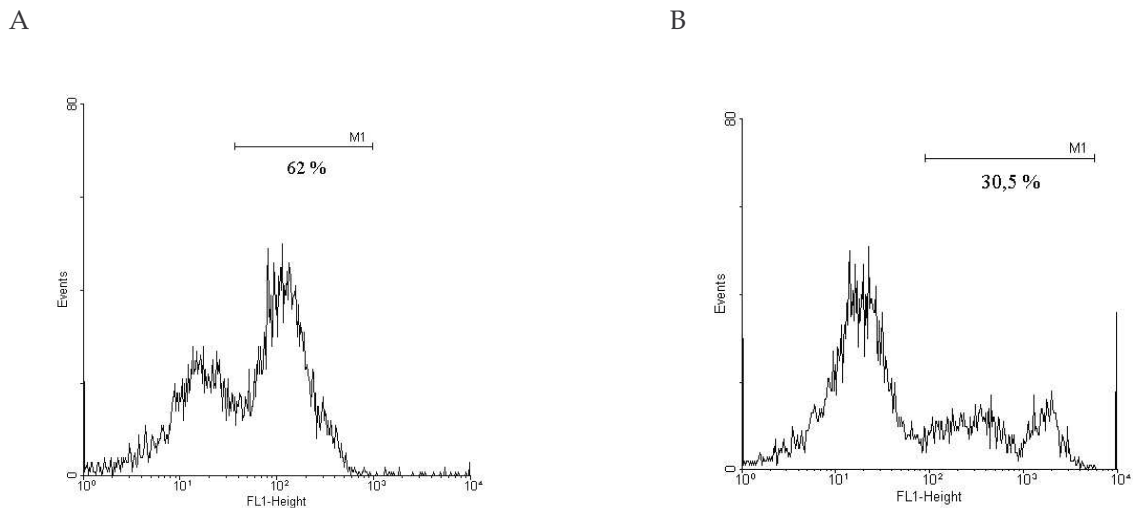


Abbildung 23: Durchflußzytometrische Analyse von unstimulierten Baumwollrattenlymphozyten der drainierenden Ohrlymphknoten. A: Färbung mit CR-CD4/FITC; B: Färbung mit CR-CD8/FITC. Abkürzungen: FL1: Fluoreszenz 1; Events: Zellzahl; M1: statistische Auswertung (%).

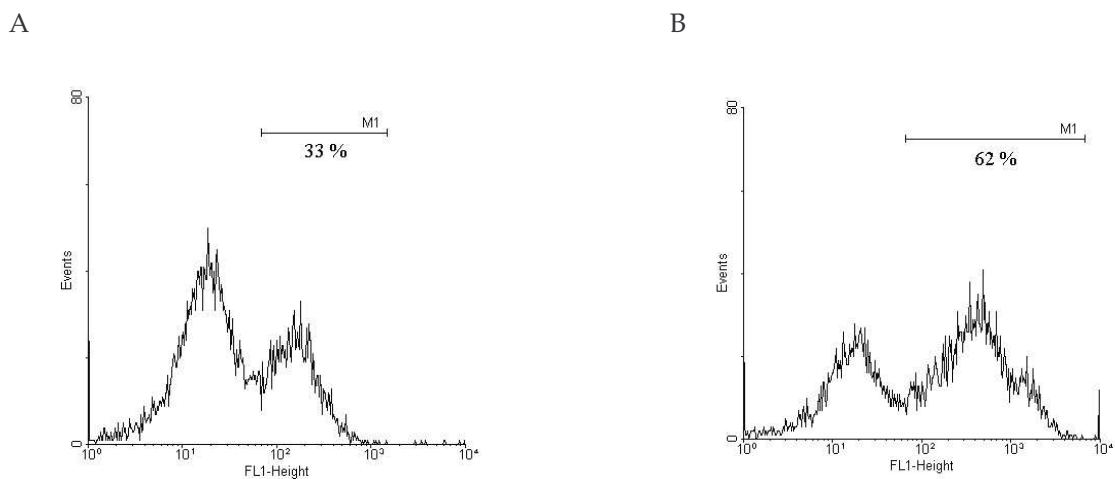


Abbildung 24: Durchflußzytometrische Analyse von DNFB-stimulierten Baumwollrattenlymphozyten der drainierenden Ohrlymphknoten. A: Färbung mit CR-CD4/FITC; B: Färbung mit CR-CD8/FITC. Abkürzungen: FL1: Fluoreszenz 1; Events: Zellzahl; M1: statistische Auswertung (%).

Tabelle 12 zeigt eine Zusammenfassung der ermittelten T-Zellverhältnisse in drainierenden Ohrlymphknoten von fünf Baumwollratten. Die durchflußzytometrische Analyse der Lymphozyten ergab, daß das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen durch DNFB-Stimulation, wie im Mausmodell, in Richtung CD8⁺ T-Zellen verschoben wurde (ohne DNFB-Stimulation 1,5:1; mit DNFB-Stimulation 1:1,7). Dabei war der Unterschied des prozentualen Anteils von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen im Durchschnitt insgesamt geringer, als im Mausmodell.

Verhältnis von CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ T-Zellen	
ohne DNFB-Stimulation (linkes Ohr)	DNFB-Stimulation (rechtes Ohr)
2 : 1	1 : 1,9
	1 : 1,9
0,9 : 1	1 : 1,9
	1 : 1,6
1,6 : 1	1 : 1,1
Mittelwert 1,5 : 1	Mittelwert 1 : 1,7

Tabelle 12: *Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen in Lymphozyten drainierender Ohrlymphknoten von Baumwollratten. Die DNFB-Stimulation erfolgte am rechten Ohr an 3 aufeinander folgenden Tagen. Am nächsten Tag wurde die durchflußzytometrische Analyse durchgeführt.*

4.2.1.2 Funktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen während der sekundären DTH-Antwort

Die Applikation von DNFB auf die Flanke von Mäusen induziert die Entwicklung von DNFB-spezifischen CD8⁺ T-Zellen. Nach sekundärem Kontakt mit DNFB auf die Ohrhaut wandern diese Zellen zum Ohr und induzieren eine Schwellung des DNFB-behandelten Ohres. CD4⁺ T-Zellen setzen diese Antwort herab (Bour et al., 1995). Im Gegensatz zum Maussystem war im Baumwollrattensystem die Funktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen im DTH-Modell noch nicht bekannt. Aus diesem Grund wurde die Funktion dieser Zellen während der sekundären DTH-Antwort analysiert. Es wurde eine Ähnlichkeit der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort zwischen den beiden Tiermodellen angenommen.

Um zu untersuchen, welche T-Zellpopulation für die Ohrschwellung verantwortlich war, wurde eine Kontaktsensibilisierung in drei Gruppen von je 3-4 Baumwollratten induziert. An Tag -10 wurden je 40 µl einer 2 %-igen DNFB-Lösung auf eine rasierte Flanke der Baumwollratten aufgetragen. An Tag 0 wurden 40 µl DNFB auf das rechte Ohr appliziert. An Tag -11, -10, -9, -6, 0, +2, +4 und +7 wurden zwei Gruppen 0,4 bis 0,5 mg CR-CD4- oder CR-CD8-Antikörper i. p. injiziert. Die Kontrollgruppe erhielt keine Antikörper. Die CD4- und CD8-Depletion wurde mit Hilfe einer

durchflußzytometrischen Analyse bestätigt. Die Ohrdicke wurde von Tag 0 bis Tag +11 täglich und zusätzlich an Tag +14 bzw. +16 in Duplikaten gemessen. Durch Differenz der rechten und der linken Ohrdicke wurde die Ohrschwellung berechnet.

Nach sekundärem DNFB-Kontakt migrierten DNFB-spezifische T-Zellen zum Ohr, wodurch eine Ohrschwellung induziert wurde (Tabelle 13). Schon einen Tag nach sekundärem DNFB-Kontakt betrug die Schwellung in nicht-depletierten Tieren 370 +/- 71 µm. Den Höchstwert der Ohrschwellung erreichte diese Kontrollgruppe an Tag +9 (1282 +/- 49 µm). Die Depletion der CD8⁺ T-Zellen mit CR-CD8 führte zu einer signifikanten Reduktion der Ohrschwellung von Tag +1 (123 +/- 57 µm; $p < 0,003$) bis Tag +10 (907 +/- 72 µm; $p < 0,003$), verglichen mit der nicht-depletierten Kontrollgruppe. Die Depletion der CD4⁺ T-Zellen führte ebenfalls zur Reduktion der Ohrschwellung von Tag +1 (251 +/- 21 µm) bis Tag +10 (1079 +/- 458 µm). Diese Reduktion war allerdings weniger stark ausgeprägt als bei den CD8⁺ T-Zell-depletierten Tieren und nur am ersten Tag statistisch signifikant ($p < 0,009$). Zehn bzw. elf Tage nach sekundärem DNFB-Kontakt gingen die Ohrschwellungen in allen Versuchsgruppen zurück. Ab Tag +10 bzw. +11 löste sich an den Ohren der entzündungsinduzierte Schorf zu verschiedenen Zeiten ab, so daß die Standardabweichungen sehr groß wurden.

Zeitpunkt der Messung	Ohrschwellung (µm)		
	keine Depletion	Depletion von CD8 ⁺ T-Zellen	Depletion von CD4 ⁺ T-Zellen
Tag +1	370 +/- 71	123 +/- 57 $p < 0,003$	251 +/- 21 $p < 0,009$
Tag +2	344 +/- 66	133 +/- 82 $p < 0,02$	242 +/- 90 $p < 0,16$
Tag +3	340 +/- 81	158 +/- 64 $p < 0,04$	236 +/- 37 $p < 0,11$
Tag +4	391 +/- 90	144 +/- 48 $p < 0,01$	269 +/- 15 $p < 0,08$
Tag +5	413 +/- 71	187 +/- 81 $p < 0,02$	365 +/- 73 $p < 0,43$
Tag +6	582 +/- 35	288 +/- 22 $p < 0,00004$	542 +/- 153 $p < 0,68$
Tag +7	917 +/- 166	450 +/- 126 $p < 0,008$	744 +/- 202 $p < 0,29$
Tag +8	1191 +/- 239	658 +/- 60 $p < 0,007$	1135 +/- 201 $p < 0,75$
Tag +9	1282 +/- 49	767 +/- 93 $p < 0,0004$	1149 +/- 274 $p < 0,46$
Tag +10	1253 +/- 88	907 +/- 72 $p < 0,003$	1079 +/- 458 $p < 0,56$
Tag +11	851 +/- 362	687 +/- 463 $p < 0,64$	960 +/- 759 $p < 0,83$

Tag +14	428 +/- 319	466 +/- 433 p < 0,91	537 +/- 661 p < 0,81
Tag +16	277 +/- 123	306 +/- 341 p < 0,9	460 +/- 626 p < 0,65

Tabelle 13: Ohrschwellung der depletierten bzw. nicht-depletierten Baumwollratten nach sekundärem DNFB-Kontakt (= Tag 0). Die Schwellung wurde durch Differenz der Ohrdicken des behandelten und nicht-behandelten Ohres berechnet. Alle Angaben sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung von 3-4 Baumwollratten (p: statistische Wahrscheinlichkeit).

In Abbildung 25 ist die Reduktion der Ohrschwellung durch CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zelldepletion graphisch dargestellt. Diese Ergebnisse zeigen eindeutig, daß CD8⁺ T-Zellen in der Kontaktsensibilisierung, ähnlich dem Mausmodell, als Haupteffektorzellen fungieren. Im Gegensatz dazu war die Rolle der CD4⁺ T-Zellen eine andere, als im Maussystem. Im Mausmodell besitzen CD4⁺ T-Zellen eine regulatorische Funktion, so daß nach Depletion dieser Zellen die Ohrschwellung ansteigt (Bour et al., 1995). In dieser Arbeit führte eine CD4⁺ T-Zelldepletion allerdings zur Reduktion der DNFB-induzierten Ohrschwellung, die weniger stark ausgeprägt war, als in der CD8⁺ T-Zelldepletierten Versuchsgruppe. Folglich schwächen die CD4⁺ T-Zellen die DNFB-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort nicht ab, sondern unterstützen vielmehr die Effektorfunktion dieser Zellen.

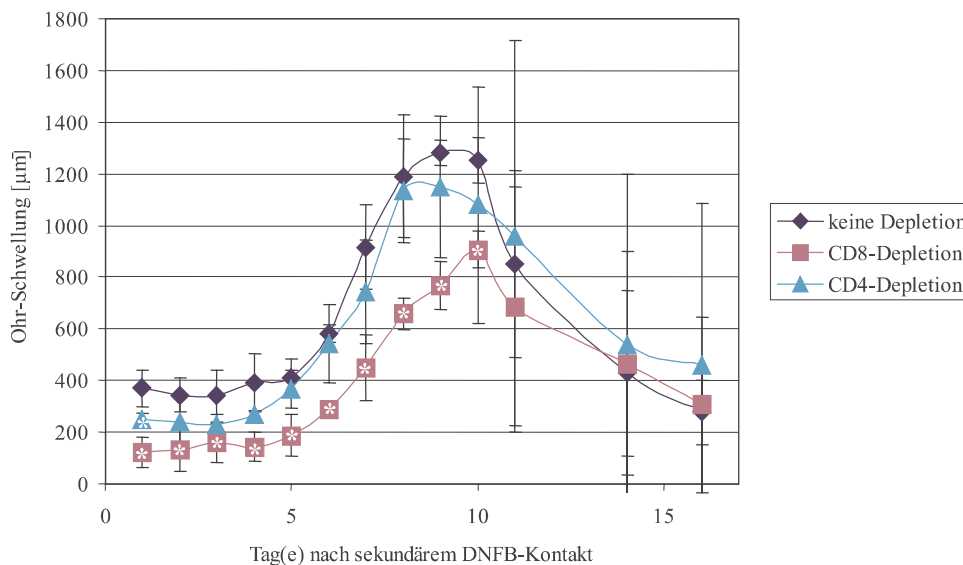


Abbildung 25: Reduktion der Ohrschwellung nach sekundärem DNFB-Kontakt durch Depletion der CD8⁺ bzw. CD4⁺ T-Zellen. Die Schwellung wurde durch Differenz der Ohrdicken des behandelten und nicht-behandelten Ohres berechnet. Jedes Symbol repräsentiert den arithmetischen Mittelwert +/- Standardabweichung von 3-4 Baumwollratten. Die statistisch signifikanten Werte sind mit einem weißen Stern im entsprechenden Symbol gekennzeichnet.

4.2.2 Einfluß von MV auf das DTH-Modell

4.2.2.1 Einfluß von MV auf die primäre DTH-Antwort

Einfluß von MV auf die DNFB-spezifische T-Zellproliferation

Eine Infektion von Baumwollratten mit MV reduziert die primäre DNFB-spezifische Proliferation in Lymphozyten von drainierenden Ohrlymphknoten (Niewiesk et al., 2000). Um diesen Einfluß der MV-Infektion auf die Proliferation der DNFB-spezifischen T-Zellen zu bestätigen, wurden Baumwollratten an Tag 0 i. n. mit MV-Edmonston (5×10^6 PFU) infiziert. An Tag 3, 4 und 5 wurden 40 µl einer 2 %-igen DNFB-Lösung auf das rechte Ohr von sechs infizierten bzw. sechs nicht-infizierten Baumwollratten appliziert. Sechs Tage nach der Infektion wurde die Proliferation von DNFB-spezifischen T-Zellen gemessen. Dafür wurden die drainierenden Lymphknoten beider Ohren entfernt und Einzelzellsuspensionen hergestellt. Die Proliferation wurde nach einem 20-stündigen Thymidineinbau ohne weitere Antigenstimulation gemessen.

In den drainierenden Lymphknoten der unbehandelten Ohren entwickelte sich eine Spontanproliferation der Lymphozyten von MV-infizierten Tieren (3884 ± 2256 cpm), im Vergleich zu Lymphozyten nicht-infizierter Baumwollratten (434 ± 316 cpm; $p < 0,003$) (Tabelle 14). Zusätzlich war die Anzahl dieser Zellen stark erhöht (ohne Infektion $3,6 \pm 2 \times 10^6$; mit MV-Infektion $13,5 \pm 8,5 \times 10^6$; $p < 0,02$). Obwohl die Anzahl der Lymphozyten in den drainierenden Lymphknoten des DNFB-behandelten Ohres infizierter Tiere ($2,1 \pm 1,1 \times 10^7$) der Anzahl nicht-infizierter Tiere ($2,0 \pm 1 \times 10^7$) glich, war die Proliferation statistisch signifikant geringer (ohne Infektion 14904 ± 4810 cpm; mit MV-Infektion 6341 ± 3939 cpm; $p < 0,02$). Eine Reduktion der DNFB-spezifischen Proliferation von T-Zellen durch MV-Infektion wurde somit bestätigt (Niewiesk et al., 2000).

Organ	keine Infektion		MV-Infektion	
	Anzahl der Zellen ($\times 10^6$)	Proliferation (cpm)	Anzahl der Zellen ($\times 10^6$)	Proliferation (cpm)
linker LK (nicht-behandelt)	$3,6 \pm 2$	434 ± 316	$13,5 \pm 8,5$ $p < 0,02$	3884 ± 2256 $p < 0,003$
rechter LK (DNFB-behandelt)	20 ± 10	14904 ± 4810	21 ± 11 $p < 0,9$	6341 ± 3939 $p < 0,02$

Tabelle 14: MV-induzierte Reduktion der DNFB-spezifischen Proliferation von T-Zellen und Spontanproliferation von Lymphozyten, 6 Tage nach Infektion. Alle Angaben sind arithmetische Mittelwerte \pm Standardabweichung. Abkürzungen: cpm: counts per minute (Zerfälle pro Minute); DNFB: Dinitrofluorobenzol; LK: Lymphknoten; p: statistische Wahrscheinlichkeit.

Einfluß von MV auf das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen

Um zu überprüfen, ob eine MV-Infektion das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen beeinflusst, wurden 4 Baumwollratten drei Tage vor der DNFB-Stimulation i. n. mit MV-Edmonston (4x10⁶ PFU) infiziert. Die 2 %-ige DNFB-Lösung wurde erneut an 3 aufeinander folgenden Tagen auf das rechte Ohr aufgetragen. Am nächsten Tag wurden die drainierenden Lymphknoten beider Ohren entfernt und der Anteil von CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie bestimmt.

Die Analyse ergab, daß das Verhältnis der T-Zellen durch DNFB-Behandlung ebenfalls in Richtung CD8⁺ T-Zellen verschoben wurde, unabhängig von einer MV-Infektion (Tabelle 15). Die Verhältnisse der CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen MV-infizierter Tiere betrug in nicht-stimulierten Lymphozyten 1,6:1 und in DNFB-stimulierten Lymphozyten 1:1,6. Diese Zusammensetzung der T-Zellen stimmte mit der Zellzusammensetzung nicht-infizierter Tiere überein (ohne DNFB-Stimulation 1,5:1; mit DNFB-Stimulation 1:1,7). Eine Infektion mit MV hatte folglich keinen Einfluß auf die Zusammensetzung der T-Zellpopulationen.

Verhältnis von CD4 ⁺ zu CD8 ⁺ T-Zellen nach MV-Infektion	
ohne DNFB-Stimulation (linkes Ohr)	DNFB-Stimulation (rechtes Ohr)
1 : 1	1 : 2,8
1,1 : 1	1 : 1,7
2,6 : 1	1 : 0,8
1,7 : 1	1 : 0,9
Mittelwert 1,6 : 1	Mittelwert 1 : 1,6

Tabelle 15: *Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen in Lymphozyten drainierender Ohrlymphknoten von Baumwollratten nach Infektion mit MV-Edmonston (4x10⁶ PFU, Tag 0). Die DNFB-Stimulation erfolgte am rechten Ohr an Tag 3, 4 und 5 nach der Infektion. Am nächsten Tag wurde die durchflußzytometrische Analyse durchgeführt.*

MHC I-Expression

Die T-Zellantwort wurde weiter analysiert, indem die Lymphknotenzellen zusätzlich mit einem MHC I-spezifischen Antikörper (W6/32) angefärbt wurden. Dieser Antikörper erkennt das menschliche β-Mikroglobulin und reagiert ebenfalls mit dem β-Mikroglobulin der Baumwollratte (Dissertation von Karen Pueschel, 2001). Die Analyse ergab eine verstärkte MHC I-Expression in DNFB-stimulierten Lymphozyten von sowohl infizierten als auch nicht-infizierten Baumwollratten. Diese starke MHC I-Expression zeigte eine DNFB-induzierte Aktivierung der Zellen. Allerdings war kein Unterschied zwischen beiden Gruppen zu erkennen.

4.2.2.2 Einfluß von MV auf die sekundäre DTH-Antwort

In einem weiteren Versuch wurde der Einfluß einer MV-Infektion auf die sekundäre DNFB-spezifische T-Zellantwort (= DTH-Antwort) untersucht. An Tag -10 wurden je 40 µl einer 2 %-igen DNFB-Lösung auf eine rasierte Flanke von zwölf Baumwollratten appliziert. 10 Tage später wurde die Hälfte der Tiere i. n. mit MV-Edmonston (5×10^6 PFU) infiziert. An Tag +3 wurde ein DNFB-Challenge durchgeführt, indem 40 µl einer 2 %-igen DNFB-Lösung auf das rechte Ohr von infizierten und nicht-infizierten Baumwollratten aufgetragen wurde.

Die MV-infizierten Tiere zeigten an Tag +5 eine reduzierte Ohrschwellung (ohne Infektion 148 ± 50 µm; mit MV-Infektion 93 ± 48 µm; $p < 0,04$) (Tabelle 16). Die sekundäre DTH-Antwort wurde folglich durch MV-Infektion inhibiert.

Infektion	Ohrschwellung (µm), 2 Tage nach sekundärem DNFB-Kontakt
keine Infektion	148 ± 50
MV-Infektion	93 ± 48 $p < 0,04$

Tabelle 16: *Inhibition der durch DNFB-Challenge induzierten Ohrschwellung durch MV-Infektion, 2 Tage nach sekundärem DNFB-Kontakt. Die Ohrschwellung wurde durch Differenz der Ohrdicken des behandelten und nicht-behandelten Ohres berechnet. Alle Angaben sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung.*

Abkürzungen: DNFB: Dinitrofluorobenzen; p: statistische Wahrscheinlichkeit.

Um die Proliferation von DNFB-spezifischen T-Zellen zu analysieren, wurde die Proliferation der Lymphknotenzellen der linken und rechten Ohrlymphknoten verglichen. Für diesen Zweck wurden die Zellen vereinzelt und mit radioaktivem Thymidin ohne zusätzliche Antigenstimulation inkubiert. Nach 20 Stunden wurde der Einbau an Radioaktivität gemessen.

In MV-infizierten Tieren gab es keinen Unterschied in der Proliferation zwischen den Lymphknotenzellen der DNFB-behandelten (3645 ± 1019 cpm) und nicht-behandelten Seite (2273 ± 990 cpm) (Tabelle 17). Im Gegensatz dazu wurde in den Kontrolltieren auf der DNFB-behandelten Seite eine statistisch signifikant stärkere Proliferation beobachtet (3073 ± 405 cpm; $p < 0,05$), als auf der nicht-behandelten Seite (1363 ± 660 cpm).

Organ	Proliferation (cpm)	
	keine Infektion	MV-Infektion
linker LK (nicht-behandelt)	1363 +/- 660	2273 +/- 990
rechter LK (DNFB-behandelt)	3073 +/- 405 p < 0,05	3645 +/- 1019

Tabelle 17: Analyse der Proliferation von DNFB-spezifischen T-Zellen, zwei Tage nach sekundärem DNFB-Kontakt. Alle Angaben sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung.

Abkürzungen: cpm: counts per minute (Zerfälle pro Minute); DNFB: Dinitrofluorobenzen; LK: Lymphknoten; p: statistische Wahrscheinlichkeit.

4.2.3 Immunaktivierung nach MV-Infektion

4.2.3.1 MV-induzierte Spontanproliferation

Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, daß die Ausbildung einer primären und sekundären DTH-Antwort durch MV gehemmt wurde. Bei der Untersuchung des Einflusses von MV auf die DNFB-spezifische T-Zellproliferation während der primären DTH-Antwort (Kapitel 4.2.2.1) wurde eine Spontanproliferation der DNFB-unbehandelten Lymphozyten MV-infizierter Tiere im Vergleich zu Lymphozyten nicht-infizierter Baumwollratten ermittelt ($p < 0,003$). Zusätzlich war die Anzahl dieser Zellen stark erhöht ($p < 0,02$) (Tabelle 14).

In einem weiteren Versuch war die Anzahl an Milzzellen von zwölf mit MV-Edmonston (5×10^6 PFU) i. n. infizierten Baumwollratten 6 Tage nach der Infektion statistisch signifikant höher ($9,5 \pm 2,8 \times 10^7$), als die Anzahl an Milzzellen von zwölf nicht-infizierten Baumwollratten ($5,7 \pm 1,0 \times 10^7$; $p < 0,009$) (Tabelle 18). Die Spontanproliferation in Milzzellen MV-infizierter Tiere (6678 ± 3410 cpm) war im Vergleich zu Milzzellen nicht-infizierter Tiere (3649 ± 2278 cpm) ebenfalls erhöht.

Die ermittelten Spontanproliferationen der Lymphozyten MV-infizierter Tiere sind Hinweise für eine Immunaktivierung nach MV-Infektion, die sich parallel zur MV-induzierten Suppression der DTH-Antworten entwickelt. Dies wird durch die Induktion einer MV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort nach Infektion mit MV gestützt (Dissertation von Karen Pueschel, 2001). Die Bildung einer MV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort ist ab Tag 5 nach der Infektion nachweisbar. An Tag 6 beträgt der Stimulationsindex (SI), bei einem Schwellenwert von 2, nahezu 5. Die Proliferation der MV-spezifischen T-Zellen ist an Tag 7 und 8 am stärksten

ausgeprägt ($SI > 7$) und fällt dann langsam ab. Diese Tatsache spricht für eine MV-induzierte Immunaktivierung.

Infektion	Anzahl der Milzzellen ($\times 10^6$)	Proliferation (cpm)
keine Infektion	57 +/- 10	3649 +/- 2278
MV-Infektion	95 +/- 28 $p < 0,009$	6678 +/- 3410 $p < 0,09$

Tabelle 18: MV-induzierte Spontanproliferation von Milzzellen, 6 Tage nach Infektion. Alle Angaben sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung.

Abkürzungen: cpm: counts per minute (Zerfälle pro Minute); p: statistische Wahrscheinlichkeit.

4.2.3.2 MV-spezifische B-Zellantwort

Der Anstieg an Zellularität wurde weiter analysiert, indem die MV-spezifische B-Zellantwort und die Aktivität der natürlichen Killerzellen (NK-Zellen) untersucht wurde. Diese Analysen wurden 6 Tage nach einer MV-Infektion durchgeführt, da zu diesem Zeitpunkt sowohl eine MV-induzierte Immunsuppression (Niewiesk et al., 1997 a; Niewiesk, 1999 b) bzw. eine Suppression der DTH-Antworten (in dieser Arbeit gezeigt), als auch eine Aktivierung von MV-spezifischen CD4⁺ T-Zellen (Dissertation von Karen Pueschel, 2001) besteht.

Die Analyse der MV-spezifischen B-Zellantwort wurde mit Hilfe verschiedener Methoden durchgeführt. Sechs Tage nach i. n. Infektion von Baumwollratten mit MV-Edmonston (4×10^6 PFU) wurde im ELISA der Titer MV-spezifischer Antikörper im Serum der Tiere bestimmt. Es wurde eine schwache Antikörperantwort gebildet. Die OD von infizierten Tieren betrug 0,4, bei einem Hintergrund von 0,3. Zusätzlich wurde ein MV-spezifischer Neutralisationstest (NT) und ein ELISPOT durchgeführt. 6 Tage nach Infektion war keine MV-spezifische B-Zellantwort im NT-Test und ELISPOT nachweisbar. Im Gegensatz dazu hatte sich 12 Tage nach Infektion eine B-Zellantwort gebildet. Die OD im ELISA betrug 1,2 (bei einem Hintergrund von 0,3), der NT-Test betrug 40. Somit wurde 6 Tage nach MV-Infektion keine B-Zellaktivierung nachgewiesen.

4.2.3.3 Aktivität der NK-Zellen

Anschließend wurde der Einfluß einer MV-Infektion auf die lytische Aktivität von NK-Zellen analysiert. Sechs Tage nach i. n. Infektion von Baumwollratten mit MV-Edmonston ($3-4 \times 10^6$ PFU) erfolgte ein Chromfreisetzungstest. Milzzellen infizierter und nicht-infizierter Tiere wurden über Nacht in verschiedenen Verhältnissen mit chrommarkierten YAC-1-Zellen inkubiert. Am nächsten Tag wurde das freigesetzte Chrom gemessen.

In parallelen Versuchsansätzen entstanden widersprüchliche Ergebnisse. In zwei Versuchen war die lytische Aktivität von NK-Zellen MV-infizierter Tiere 6 Tage nach Infektion stark erhöht, verglichen mit nicht-infizierten Baumwollratten (Abbildung 26). In drei Versuchen glichen bzw. übertrafen die prozentualen Lysewerte der Kontrolltiere die Werte infizierter Tiere (Daten nicht dargestellt). Daher konnte keine eindeutige Aussage darüber getroffen werden, ob eine Infektion mit MV die lytische Aktivität von NK-Zellen beeinflusst. Die Aktivität von NK-Zellen konnte nicht als Parameter für eine MV-induzierte Immunaktivierung verwendet werden, die sich parallel zur MV-induzierten Immunsuppression bzw. zur Suppression der DTH-Antworten entwickelte.

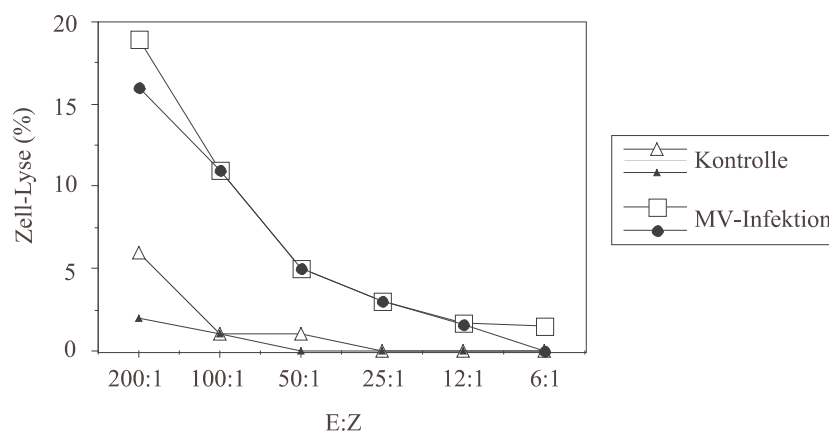


Abbildung 26: Möglicher Einfluß von MV auf die lytische Aktivität von NK-Zellen, mit Hilfe eines Chromfreisetzungstestes (6 Tage nach Infektion). Jedes Symbol repräsentiert ein Tier. In einem weiteren Versuchsansatz entstand ein gegensätzliches Ergebnis (Daten nicht dargestellt). E:Z: Verhältnis von Effektorzellen (Milzzellen) zu Zielzellen (YAC-1).

4.2.4 Mögliche Ursache der simultanen Entstehung einer Immunsuppression und Immunaktivierung nach MV-Infektion

Eine mögliche Erklärung der gleichzeitigen Entstehung einer Suppression von DTH-Antworten und Immunaktivierung nach MV-Infektion ist die dreitägige Entwicklungsdauer einer Immunsuppression nach MV-Infektion (Niewiesk et al., 1997 a; Niewiesk, 1999 b). Während dieser Zeit könnte sich eine MV-spezifische Immunantwort bilden. Nach Entstehung der Immunsuppression könnte es sein, daß die neu induzierte Immunantwort nicht mehr gestoppt werden kann, aber gleichzeitig keine Immunantwort gegen Drittantigene (zum Beispiel DNFB) möglich ist. Um diese Theorie zu überprüfen, wurde untersucht, ob die MV-induzierte Immunsuppression nur Drittantigene beeinflusste oder auch das MV selbst.

Überprüfung der MV-Glykoprotein-induzierten Immunsuppression *in vitro*

Die Immunsuppression wird *in vivo* und *in vitro* durch die gleichzeitige Expression der MV-Glykoproteine F und H ausgelöst (Schlender et al., 1996; Niewiesk et al., 1997 a). Diese Inhibition sollte in Baumwollratten durch eine i. p. Injektion von humanen Fibroblasten ausgelöst werden, die nach Transfektion beide MV-Glykoproteine exprimierten (Niewiesk et al., 1997 a). Für diesen Zweck sollte das Hämagglutinin von MV-WTF eingesetzt werden. Da in den bisherigen Studien das Hämagglutinin von MV-CAM verwendet wurde (Niewiesk et al., 1997 a), musste zuerst die *in vitro*-Induktion der Immunsuppression durch Koexpression von F und WTF-H von MV gezeigt werden.

293-F-Zellen wurden mit dem Plasmid pCG-WTF-H-B₁ mittels Lipofektin transient transfiziert und ausplattiert. Als Kontrolle dienten nicht-transfizierte Zellen. Nach Adhäsion der Zellen und UV-Inaktivierung, wurden Milzzellen einer naiven Baumwollratte zugegeben. Die Zellen wurden mit ConA (2,5 bzw. 5 µg/ml) stimuliert und mit Hilfe eines Proliferationstestes analysiert. Dabei wurde der Einbau des Methyl-³H-Thymidin in die naiven Milzzellen gemessen, die durch Kontakt mit den koexprimierten Glykoproteinen inhibiert werden sollten.

Die Proliferation der naiven Milzzellen wurde durch Koexpression von F und WTF-H auf 43 % (2,5 µg/ml ConA) bzw. 30 % (5 µg/ml ConA) gesenkt (Tabelle 19). Somit wurde die *in vitro*-Induktion der Immunsuppression nachgewiesen.

Zellen	Proliferation (%)	
	ConA (2,5 µg/ml)	ConA (5 µg/ml)
293-F und Milzzellen	100	100
293-F/H und Milzzellen	43	30

Tabelle 19: *Immunsuppressionsnachweis in vitro, induziert durch Koexpression von F und WTF-H von MV, mit Hilfe eines Proliferationstests. Es wurde die Proliferation von naiven Milzzellen gemessen, die durch Kontakt mit F und H inhibiert wurden. Die Proliferation der koinkubierten 293-F-Zellen wurde mit 100 % angegeben.*

Einfluß der MV-Glykoprotein-induzierten Immunsuppression auf die MGV-spezifische Immunantwort *in vivo*

Die Immunsuppression wurde in Baumwollratten durch eine i. p. Injektion von humanen Fibroblasten ausgelöst, die nach Transfektion beide MV-Glykoproteine exprimierten (Niewiesk et al., 1997 a). Für diesen Zweck wurden 293-F-Zellen mit dem Plasmid pCG-WTF-H-B₁ mittels Lipofektin transient transfiziert und je $1,4 \times 10^7$ 293-F/H-Zellen pro Baumwollratte i. p. injiziert. Zur Kontrolle wurde die gleiche Anzahl an 293-F-Zellen injiziert, da bekannt war, daß nur die gleichzeitige Expression von F und H eine Immunsuppression auslöst (Niewiesk et al., 1997 a).

4 Tage später wurden die Tiere mit dem rekombinanten MV MGV infiziert. In diesem Virus sind die viralen Glykoproteine F und H durch das Glykoprotein des vesikulären Stomatitisvirus ersetzt, das MV-Nukleokapsidprotein ist allerdings unverändert. Durch Infektion mit MGV wird keine Mitogen-stimulierte Proliferationshemmung induziert (Niewiesk et al., 1997 a). Es wurden je $2,8 \times 10^5$ PFU Mykoplasmen-enthaltendes MGV zusammen mit 1 µg MALP-2 i. p. injiziert. Sowohl die Mykoplasmen, als auch das Immunstimulanz MALP-2 dienten zur Aktivierung der MGV-spezifischen Immunantwort.

8 Tage nach MGV-Infektion wurde die Bildung einer MGV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort in einem Proliferationstest untersucht. Dazu wurden die Milzen entnommen und Einzelzellsuspensionen mit MGV-Antigen stimuliert. Das Antigen wurde zuvor an die Zellkulturplatte gebunden (10 µg/ml). Diese Analyse der MGV-spezifischen Immunantwort sollte über die oben beschriebene Theorie Aufschluß geben.

Baumwollratten, die 293-F/H-Zellen injiziert bekamen, zeigten einen Trend zu einer schwächeren MGV-spezifischen T-Zellantwort als die Kontrolltiere (Tabelle 20). Die Inhibition der MGV-spezifischen Immunantwort durch die Immunsuppression war

statistisch nicht signifikant ($p < 0,33$). Aufgrund dieser Analyse wurde vermutet, daß die Dauer der Entwicklung einer MV-induzierten Immunsuppression eine mögliche Erklärung für das gleichzeitige Auftreten einer Suppression von DTH-Antworten und Immunaktivierung nach einer MV-Infektion sein könnte.

Injektion von $1,4 \times 10^7$ Zellen	Stimulations- index
293-F (3 Tiere)	12,2 +/- 2,8
293-F/H (6 Tiere)	8,4 +/- 5,6 $p < 0,33$

Tabelle 20: *Analyse der MGV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort unter Einfluß der Immunsuppression, induziert durch intraperitoneale Injektion von 293-F/H-Zellen, mit Hilfe eines Proliferationstestes (8 Tage nach MGV-Infektion). Der Stimulationsindex liegt bei allen Tieren über 2 und beweist dadurch eine MGV-spezifische CD4⁺ T-Zellantwort. Alle Angaben sind arithmetische Mittelwerte +/- Standardabweichung (p: statistische Wahrscheinlichkeit). Zur Kontrolle wurde ein weiterer Zellsuspensionsansatz mit ConA (2,5 µg/ml) stimuliert (Daten nicht gezeigt). Der Stimulationsindex von 88 bis 467 zeigt eine starke ConA-stimulierte Zellproliferation.*

5. Diskussion

Das MV ist der Erreger der akuten Masern, einer weltweit verbreiteten hochkontagiösen Infektionskrankheit des Menschen. Trotz existierender Lebendvakzine gegen eine Infektion wird diese Erkrankung zu den zehn häufigsten und zehn tödlichsten Infektionskrankheiten weltweit gezählt. Die erhöhte Empfänglichkeit von Kindern für Sekundärinfektionen, die man während und noch Monate nach einer überwundenen Infektion beobachtet (Katz et al., 1995), wird auf die ausgeprägte Immunsuppression zurückgeführt (Morley, 1969). Isolierte PBL von MV-infizierten Personen zeigen in Gegenwart von Mitogenen eine stark reduzierte Proliferation *ex vivo* (Griffin, 1995). Die Inhibition der Proliferation wird als Parameter für die Immunsuppression verwendet. Die Mechanismen, die dieser Immunsuppression zugrunde liegen, sind noch nicht vollständig geklärt, wobei die Inhibition der Proliferation auf die beiden viralen Glykoproteine F und H zurückgeführt wird (Schlender et al., 1996; Niewiesk et al., 1997 a). Aufgrund der unterschiedlichen Fähigkeit der Glykoproteine von MV-Wildtyp und Impfstamm eine Immunsuppression auszulösen (Dissertation von Joanna Pfeuffer, 2002), ist es wichtig, den immunsuppressiven Effekt von F und H *in vivo* näher zu analysieren.

Zu diesem Zweck sollte in der hier vorgestellten Arbeit ein neues transgenes Mausmodell etabliert werden. Dieses Tiermodell wurde gewählt, da Mäuse ein genetisch und immunologisch gut charakterisiertes System darstellen. Es handelt sich um ein konditionell transgenes Mausmodell (TetOn-System), in dem die für die Immunsuppression verantwortlichen MV-Glykoproteine eines Wildtypstammes gewebespezifisch und Tetrazyklin-regulierbar exprimiert werden sollten.

Um transgene Mäuse mit einer Tetrazyklin-induzierbaren Expression von WTF-F und WTF-H zu produzieren, mußten anfangs transgene Mäuse hergestellt werden, die die Gene beider Proteine unter Kontrolle eines Transaktivator-abhängigen bidirektionellen Promotors tragen. Aus 780 durchgeführten Mikroinjektionen gingen 102 Mäuse hervor, von denen nur vier Tiere das injizierte Fragment in ihrem Genom enthielten (Mauslinie 1-4). Diese transgenen Mäuse konnten mit Hilfe von PCR- und Southern-Blot-Analysen vollständig charakterisiert werden. Linien 1, 2 und 4 trugen ungefähr 10 Kopien in tandemartiger Anordnung in ihrem Genom, Linie 3 hingegen nur eine einzelne Kopie. Die Anzahl der integrierten Kopien beträgt für ein Standardtransgen normalerweise 1-50, es wurden jedoch auch schon

bis zu 1000 Kopien beobachtet (Lo and Kirby, 1987). Dabei integrieren diese Kopien fast immer tandemartig in einer 5'-3', 5'-3'-Anordnung (Palmiter and Brinster, 1986; Hammes and Schedl, 2000). Eine Integration in verschiedene Stellen des Mausgenoms ist ein sehr seltenes Ereignis (Hammes and Schedl, 2000). Nach der 1. Mendelschen Regel sind in der F1-Generation eines heterozygoten und eines Wildtyp-Elternteils ungefähr 50 % der Tiere für das Transgen heterozygot. Bei mehreren Integrationsstellen würde diese Zahl deutlich höher liegen. Da dies bei keiner der erzeugten Linien der Fall war, war die Integration des injizierten Fragments in nur eine Stelle des Genoms als sehr wahrscheinlich anzusehen. Dies wurde durch Southern-Blot-Analysen bestätigt.

Wie bereits erwähnt, führte die Mikroinjektion des TetOn-Konstrukts zu einer bemerkenswert kleinen Anzahl an transgenen Mäusen. Darüberhinaus war eines der vier entstandenen Tiere in homozygoter Form nicht züchtbar. Expressionsanalysen zeigten, daß in zwei der restlichen drei Mauslinien das Transgen stumm blieb. Desweiteren war die Expression in einer Linie so gering, daß nur gelegentlich eine Proteinexpression in den Mäusen nachweisbar war. Diese Ergebnisse deuten auf eine starke Selektion gegen die Expression der MV-Glykoproteine F und H.

Die Tatsache, daß aus 780 Mikroinjektionen nur 4 transgene Mäuse entstanden, korreliert nicht mit den in der Literatur angegebenen Werten, die bei der Herstellung transgener Tiere typischerweise auftreten. Durch Mikroinjektion eines linearisierten Plasmids entstehen normalerweise aus bis zu 30 % der erfolgreich injizierten und transferierten Embryos transgene Tiere (Hammes and Schedl, 2000). Es ist denkbar, daß die geringe Anzahl an transgenen Tet-Mäusen auf eine Restexpression von F und H im nicht-induzierten Tet-System (sogenannte Leakiness) zurückzuführen ist, die sich negativ auf die Embryogenese ausgewirkt haben könnte. Die Leakiness eines Konstrukts, das einen Minimalpromotor und Tet-Operator enthält, wird als dessen intrinsische Aktivität in Zellen definiert. Die intrinsische Aktivität von Minimalpromotoren kann durch die verschiedensten Komponenten beeinflusst werden. Bei einer transienten Transfektion ist die Leakiness des Tet-Systems abhängig von der Anzahl der Genkopien in der Zelle (die wiederum von der transfizierten DNA-Menge abhängt), und der intrinsischen Restaktivität des Minimalpromotors. Außerdem kann die intrinsische Aktivität eines Minimalpromotors in verschiedenen Zelllinien variieren. Veränderungen innerhalb des Plasmids durch zusätzliche Sequenzelemente, die als Verstärker wirken könnten, sind ebenfalls ein wichtiger Aspekt (Bujard, 1996). Allerdings sind die verwendeten Introns, die für diese Arbeit in den Vektor pBI4_liFiH6 eingeführt wurden, keine Verstärkerelemente.

Nach erfolgter Integration einer Minimalpromotor-Tet-Operator-Sequenz in ein Chromosom wird die Leakiness komplett verändert, da umgebende Chromatinstrukturen die Restexpression von Minimalpromotoren drastisch reduzieren. Im Gegensatz dazu können Minimalpromotoren durch benachbarte

Verstärker aktiviert werden und selbst zum Verstärker werden. Zusätzlich kann ein sogenannter transkriptioneller read-through durch außenliegende Promotoren erfolgen (Bujard, 1996), so daß die Transkription durch ein stromaufwärtsliegendes Terminationssignal nicht abgebrochen wird. Diese Aspekte stützen die Annahme, daß die geringe Anzahl an transgenen Tet-Mäusen auf eine schädliche Restexpression von F und H während der Embryogenese zurückzuführen ist. Mit Hilfe von Transkriptionsanalysen wurde keine Restexpression von F und H in den vier Tet-Mäusen festgestellt, so daß tatsächlich nur Tiere mit einer starken Expressionskontrolle des Transgens geboren wurden. Leider stellte sich diese Kontrolle als zu stark heraus, so daß nur eine von insgesamt vier Linien eine leichte Tet-Induzierbarkeit aufwies.

Die Hypothese einer starken Selektion gegen die Expression der MV-Glykoproteine F und H wird durch das Zuchtverhalten einer Linie und Expressionsanalysen von doppelt-transgenen Tieren unterstützt, die das komplette TetOn-System besitzen. Das Transgen konnte zwar von allen vier Linien an ihre Nachkommen vererbt werden, aber nur 5 Tiere von 39 F1-Nachkommen der Linie 2 waren transgen. Wie bereits erwähnt, war diese Linie in der F2-Generation bzw. in homozygoter Form nicht züchtbar. Dies deutet darauf hin, daß es sich bei dieser Linie um eine Insertionsmutante handelte. Eine Insertionsmutante kann durch zufällige Integration des Transgens in ein endogenes Gen entstehen, welches daraufhin zerstört wird. Nach einer heterozygoten Mutation entwickeln diese Gene oftmals keinen Phänotyp, so daß die Tiere unauffällig sind. Anders verhält es sich bei der Kreuzung zu homozygoten Mäusen. Ein Teil der transgenen Linien zeigt dann aufgrund des zerstörten Gens einen veränderten Phänotyp (Costantini and Son, 1989; Hammes and Schedl, 2000). Ungefähr 5-10 % von transgenen Mäusen sind Insertionsmutanten, deren Phänotyp erst in homozygoter Form pathologisch wird (Hammes and Schedl, 2000).

Die restlichen drei Linien wurden mit T-Zell-spezifischen Induziermäusen gekreuzt, die den Transaktivator rtTA unter Kontrolle des regulatorischen Elements des humanen CD2-Promotors exprimieren. Diese Induziermäuse wurden ausgewählt, da das regulatorische Element des humanen CD2-Promotors eine Expression von Reportergenen auf der Oberfläche fast aller einfach positiven CD4⁺CD8⁻ und CD4⁻CD8⁺ reifer T-Lymphozyten auslöst (Zhumabekov et al., 1995), und genau diese Zellen durch MV in ihrer Proliferation gehemmt werden. In T-Zell-spezifischen Mäusen findet die Tetrazyklin-induzierbare Expression in Milz und Thymus statt, aber nicht in Leber, Herz und Lunge (Legname et al., 2000). Expressionsanalysen der doppelt-transgenen Mäuse mit F und H von MV ergaben, daß die Expression in Linie 1 und 4 nicht induzierbar war, sowohl *in vitro* als auch *in vivo*. In der letzten verbleibenden Linie 3 wurde zwar eine Tetrazyklin-induzierbare Transkription von F- und H-mRNA in Milz und Thymus festgestellt, allerdings war die Translation nur sehr schwach. In einer einzigen Maus konnte eine schwache Produktion von Hämagglutininprotein nachgewiesen werden. Auffallend war, daß die induzierbare

Linie 3 nur eine einzelne Kopie des Transgens im Genom enthielt, und die Linien mit mehreren Kopien nicht induzierbar waren. All diese Aspekte deuten auf eine starke Selektion gegen eine Expression von F und H. Es ist möglich, daß die transgenen Tiere mit mehreren Genkopien nur aufgrund einer nicht-induzierbaren Expression der Glykoproteine geboren wurden. Weiterhin ist anzunehmen, daß die Expression von F und H aufgrund der mehrfachen Kopien ansonsten zu stark und daher schädlich gewesen wäre.

Der toxische Effekt von F und H auf die transgenen Mäuse ist vermutlich nicht auf die Proliferationshemmung zurückzuführen, die *in vitro* und *in vivo* durch die Glykoproteine ausgelöst wird (Schlender et al., 1996; Niewiesk et al., 1997 a), sondern vielmehr auf eine F- und H-bedingte Zellfusion. Die Glykoproteine vermitteln die Anheftung des Virus an die Rezeptoren der Zielzelle und den Viruseintritt. Nach einer Infektion mit MV bindet H an die MV-Rezeptoren CD46/CD150. Diese Bindung führt in Anwesenheit von F zu einer Fusion der Zellen (Varior-Krishnan et al., 1994). Aus diesem Grund fusionieren humane und manche Affenzelllinien, wenn sie den humanen MV-Rezeptoren ähnliche Moleküle tragen, nach Kontakt mit F und H. In Lymphknoten von MV-infizierten Personen findet ebenfalls gelegentlich eine Zellfusion statt (Griffin and Bellini, 1996). Manche Nagetierzellen nehmen MV auf (Doerig et al., 1993; Naniche et al., 1993; Nussbaum et al., 1995), obwohl ein intrazellulärer Block die Virusreplikation verhindert. Die Empfänglichkeit von Nagetierzellen für MV wird durch Transfektion oder transgene Expression von verschiedenen Isoformen des CD46-Moleküls verbessert (Gerlier et al., 1994; Manchester et al., 1994; Niewiesk et al., 1997 b) und führt zu einer Fusion innerhalb von 6 bis 8 Stunden, die mit der von menschlichen Zellen vergleichbar ist. Allerdings konnte auch gezeigt werden, daß während einer chronischen Infektion die auf der Mauszelle exprimierten Rezeptoren zur Zellfusion ausreichend sind (Rager-Zisman et al., 1984).

Das erklärt auch, warum es nicht möglich war, Nagetierzellen mit stabiler Expression der MV-Glykoproteine F und H herzustellen (unveröffentlichte Daten). Ebenso war es nicht möglich, HeLa rtTA-Zellen mit dem Vektor pBI4_liFiH6 stabil zu transfizieren (eigene unveröffentlichte Daten; Daten von Dr. A. Davidson). Obwohl bislang der mit dem MV-Hämagglutinin interagierende Rezeptor noch nicht definiert worden ist, ist der toxische Effekt der stabilen F- und H-Expression auf Nagetierzellen vermutlich auf eine Zellfusion zurückzuführen.

Es ist unklar, aus welchen genetischen Gründen die nicht-induzierbaren Tet-Linien eine komplette Repression des Transgens aufwiesen. Ein bedeutender Faktor ist der sogenannte Positioneffekt, der die Expression von Transgenen nicht nur reduziert, sondern auch vollständig verhindern kann. Die Expressionsstärke ist anscheinend weniger abhängig von der Anzahl der integrierten Genkopien, als von den

genomischen Sequenzen, die das Transgen flankieren. Dabei können spezifische Abschaltesequenzen, die in Cis-Stellung vor dem Promotor liegen, die Transkription verhindern. Die gleiche Wirkung wird bei der Integration in eine transkriptionell inaktive Region des Genoms erzielt. Flankierende Sequenzen können auch regulatorische Elemente benachbarter Gene enthalten, die sich aktivierend auf den Promotor des Transgens auswirken. Dies kann zu einer ektopischen Expression des Transgens führen (Hammes and Schedl, 2000).

Die Expressionsstärke wird auch von der Konstruktion des inserierten Fragments beeinflusst. Das in dieser Arbeit verwendete Konstrukt der transgenen Tet-Mäuse enthält alle Elemente, die für eine starke Expression notwendig sind. Es besitzt sowohl ein Intron stromabwärts des Transkriptionsstartpunktes (Choi et al., 1991; Palmiter et al., 1991) von F bzw. H und ein Polyadenylierungssignal am 3'-Ende (Hammes and Schedl, 2000), als auch das stark konservierte Adenin der Kozak-Consensus-Sequenz an Position -3 (Kozak, 1987).

Eine alternative Erklärung für die schwache bzw. fehlende Induktion des Tet-Systems *in vivo* ist eine mögliche Instabilität des Tet-Systems. Die Menge an produzierter Transaktivator-mRNA nimmt generationsabhängig ab. So wurde von einer drastischen Reduktion der tTA-Expression von der F2- zur F4-Generation bzw. F4- zur F10-Generation berichtet. Ebenso nahm die Aktivität des Reportergens Luziferase von der F2- zur F10-Generation (bezogen auf die Transaktivatorgeneration) um das 8- bis 10-fache ab (Fedorov et al., 2001). Es ist unklar, ob die in dieser Arbeit vorgestellten Expressionsanalysen von einer möglichen Instabilität des Tet-Systems beeinflusst wurden. Schließlich wurde schon von einer Vielzahl an Tet-Mäusen mit funktionierender Induzierbarkeit berichtet, ohne Angaben der Transaktivatorgeneration (Kistner et al., 1996; Ray et al., 1997; Legname et al., 2000).

Die Expressionsstärke ist anscheinend direkt von der Transaktivatordosis abhängig. So wurde die Expression der β -Galaktosidase mit einem Transaktivator in homozygoter Form gemessen, aber nicht mit einem Transaktivator in heterozygoter Form (Fedorov et al., 2001). Die für diese Arbeit verwendete T-Zell-Induziermaus enthielt drei Kopien des Transaktivators. Die damit hergestellten doppelt-transgenen F/H-exprimierenden Mäuse trugen den Transaktivator zwar nur in heterozygoter Form, allerdings wurde mit drei Kopien eine ähnlich starke Luziferaseaktivität gemessen, wie mit fünf Transaktivatorkopien (Legname et al., 2000). Daher wird angenommen, daß die Expressionsstärke durch einen homozygoten Transaktivator nur unbedeutend größer gewesen wäre.

Um die Rolle von F und H bei der Auslösung einer MV-induzierten Immunsuppression zu analysieren, wurde die MV-spezifische Immunantwort nach induzierter Expression untersucht. Allerdings konnte nur in einzelnen doppelt-transgenen Mäusen der Linie 2 eine schwache MV-spezifische B- und T-Zellantwort

nachgewiesen werden. Diese nur geringe Auswirkung war auf die schwache bzw. nicht-nachweisbare Expression der MV-Glykoproteine F und H zurückzuführen.

Nagetierzellen fusionieren nach chronischer Expression von H und F miteinander (Rager-Zisman et al., 1984). Aus diesem Grund wurde überprüft, ob eine schwache Expression von F und H in dem neuen Mausmodell einen Einfluß auf die Thymozytenanzahl bzw. auf die Zerstörung der Zellen bewirkte. Mit Hilfe von Kinetikanalysen der Thymozytenanzahl wurde keine F- und H-induzierte Zellfusion bzw. kein Zelltod nachgewiesen. Ebenso konnte keine F- und H-induzierte Immunsuppression nachgewiesen werden. Es wird angenommen, daß die Expression von F und H zu schwach war, um zelluläre und immunologische Veränderungen auszulösen.

Um auch geringe immunsuppressive Effekte kumulativ über die Zeit sichtbar zu machen, wurde eine Langzeit-F/H-Expression durchgeführt. Parallel dazu wurden die Tiere mit „Friend Virus“ (FV) infiziert. C57BL/6-Mäuse sind resistent gegen die Induktion eines Milztumors nach einer FV-Infektion. Durch Depletion der CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen werden diese Tiere allerdings empfänglich für FV-Infektionen und entwickeln 6-11 bzw. 6-8 Wochen nach FV-Infektion einen Milztumor (Hasenkrug, 1999). Es wurden zwar leichte Milzvergrößerungen festgestellt, diese wurden jedoch auf eine Leberdeformation zurückgeführt, ausgelöst durch eine Überdosierung von Doxyzyklin (Forth et al., 1987). Die Tiere wurden durch eine 23-wöchige Behandlung mit Doxyzyklin nicht empfänglich für FV-Infektion, somit konnten keine geringen immunsuppressiven Effekte kumulativ über die Zeit nachgewiesen werden.

Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Mausmodells wurde gezeigt, daß die Expression der MV-Glykoproteine F und H einen starken toxischen Effekt auf Mäuse ausübt. Dieser toxische Effekt könnte bei der MV-induzierten Immunsuppression eine Rolle spielen. Es wird zwar angenommen, daß die in MV-infizierten Patienten beobachtete Lymphopenie bei gleichbleibendem CD4/CD8-Verhältnis (Arneborn and Biberfeld, 1983; Ward et al., 1990) eher auf eine anormale Migration der Lymphozyten zurückzuführen ist, als auf eine Zelllyse. Außerdem wurde sowohl in humanen Lymphozyten *in vitro*, als auch in Milzzellen von Baumwollratten *ex vivo* gezeigt, daß die Inhibition der Proliferation unabhängig von einer F/H-vermittelten Zellfusion entsteht (Niewiesk et al., 1999 a). Nichtsdestotrotz sind die Auswirkungen einer Zellfusion auf das Immunsystem *in vivo* schlecht abschätzbar. In Lymphknoten von MV-infizierten Personen wird gelegentlich eine Zellfusion beobachtet (Griffin and Bellini, 1996), ebenso in immundefizienten Patienten mit einer Riesenzell-Pneumonie.

Die in dieser Arbeit vorgestellten Daten der neu etablierten Tet-Maus zeigen, daß die Bedeutung des toxischen Fusionseffekts durch F und H für die Pathogenese der MV-Infektion möglicherweise revidiert werden muss.

In einem zweiten Teil dieser Dissertation wurde das in Mäusen etablierte kutane Hypersensitivitätsmodell mit DNFB im Baumwollrattensystem etabliert. Damit wurde der Einfluß von MV auf die Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp (DTH-Reaktion) analysiert. Im Menschen wird die DTH-Reaktion gegen Tuberkulin durch MV gehemmt (Pirquet, 1908; Fireman et al., 1969). Dies ist ein Zeichen für die MV-induzierte Immunsuppression.

DNFB ist ein Hapten und wirkt nach Bindung an schwefelhaltige Proteine als starkes T-Zellantigen. Nach Applikation auf die Haut von Tieren wird eine primäre bzw. sekundäre DTH-Antwort ausgelöst. Im Gegensatz zur Maus war in der Baumwollratte die Funktion der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellen während der DTH-Antwort nicht bekannt. Die Applikation von DNFB auf die Flanke von Mäusen induziert die Entwicklung von DNFB-spezifischen CD8⁺ T-Zellen (Bour et al., 1995; Kehren et al., 1999). Nach sekundärem Kontakt von DNFB auf die Ohrhaut wandern diese Zellen zum Ohr und induzieren eine Schwellung des DNFB-behandelten Ohres. Die Entwicklung von CD8⁺ T-Zellen ist zwar unabhängig von CD4⁺ T-Zellen (Desvignes et al., 1996), allerdings wird die DNFB-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort durch DNFB-spezifische CD4⁺ T-Zellen abgeschwächt (Bour et al., 1995). Depletion mit CD8-Antikörpern hemmt die DTH-Antwort vollständig. Im Gegensatz dazu führt eine Depletion mit CD4-Antikörpern zu einer gesteigerten und anhaltenden Ohrschwellung. Somit übernehmen CD8⁺ T-Zellen in der Maus eine Effektorfunktion, CD4⁺ T-Zellen eine regulatorische Funktion (Bour et al., 1995).

Es wurde eine Ähnlichkeit der CD4⁺ und CD8⁺ T-Zellantwort zwischen den Tiermodellen Maus und Baumwollratte angenommen. Um zu untersuchen, welche T-Zellpopulation für die Ohrschwellung in der Baumwollratte verantwortlich war, wurde eine sekundäre DNFB-Reaktion in drei Gruppen von Baumwollratten ausgelöst. In zwei Gruppen wurden die CD4⁺ bzw. CD8⁺ T-Zellen depletiert. Dies war nur durch die Entwicklung des neuen Baumwollrattenantikörpers CR-CD4 möglich, dessen funktionelle Depletion *in vivo* nachgewiesen wurde (Dissertation von Karen Pueschel, 2001). Die Depletion von CD8⁺ T-Zellen führte zu einer signifikanten Reduktion der Ohrschwellung an Tag 1, 2, 3 und 4 nach sekundärem DNFB-Kontakt. Im Gegensatz zum Mausmodell induzierte die Depletion von CD4⁺ T-Zellen keinen Anstieg der Ohrschwellung. Anstatt dessen war die Ohrschwellung reduziert, allerdings weniger stark als bei der CD8-depletierten Gruppe.

Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen eindeutig, daß CD8⁺ T-Zellen auch in der Baumwollratte als Haupteffektorzellen der DTH-Reaktion fungieren, ähnlich dem Mausmodell. Im Gegensatz dazu ist die Rolle der CD4⁺ T-Zellen eine andere als in der Maus. Diese Zellen schwächen die Effektorfunktion der CD8⁺ T-Zellen nicht ab, sondern unterstützen vielmehr die Funktion der CD8⁺ T-Zellen.

Im Baumwollrattenmodell war bekannt, daß die primäre DNFB-spezifische T-Zellproliferation durch MV während der akuten Infektionsphase (6 Tage nach Infektion) reduziert wird, nicht jedoch in der frühen und späten Phase (1 Tag bzw. 13 Tage nach Infektion) (Niewiesk et al., 2000; Avota et al., 2001). Eine reduzierte Aktivität der Akt-Kinase geht dieser inhibierten T-Zellproliferation voraus (Avota et al., 2001), was wiederum mit einer verminderten Zellzyklusprogression korreliert (Niewiesk et al., 1999 a).

Um im Rahmen dieser Arbeit die Suppression der primären DNFB-Antwort genauer zu analysieren, wurden Baumwollratten mit MV infiziert und deren Ohrhaut mit DNFB benetzt. 6 Tage nach der Infektion konnte die früher beobachtete Proliferationshemmung von DNFB-spezifischen CD8⁺ T-Zellen in MV-infizierten Tieren (Niewiesk et al., 2000; Avota et al., 2001) bestätigt werden. Dabei war die Anzahl der Lymphknotenzellen zwischen infizierten und nicht-infizierten Tieren vergleichbar. Dieses Ergebnis zeigt, daß die *ex vivo* beobachtete MV-induzierte Immunsuppression ebenso *in vivo* für T-Zellantworten relevant ist.

Im Mausmodell wird die sekundäre DTH-Antwort durch MV reduziert. Nach intraperitonealer Injektion von UV-inaktiviertem MV ist die Ohrschwellung leicht reduziert (Marie et al., 2001). Um diese Beobachtung im Baumwollrattenmodell zu überprüfen, wurde DNFB auf die Flanke der Tiere aufgetragen. Nach Infektion mit MV und sekundärem DNFB-Kontakt war die Ohrschwellung nicht-infizierter Tiere statistisch signifikant stärker als die Schwellung infizierter Tiere.

Diese Daten zeigen, daß in der Baumwollratte sowohl die primäre als auch sekundäre DNFB-spezifische T-Zellantwort durch MV unterdrückt wird. Ebenso supprimiert das Virus im Menschen die DTH-Reaktion gegen Tuberkulin (Pirquet, 1908; Fireman et al., 1969). Somit korreliert die Beobachtung einer reduzierten DTH-Antwort in der MV-infizierten Baumwollratte sehr gut mit den Ergebnissen aus Untersuchungen an Menschen und Mäusen.

Um die DNFB-spezifische T-Zellantwort weiter zu analysieren, wurde das Verhältnis der verschiedenen T-Zelltypen, die Anzahl dieser Zellen und deren MHC I-Expression überprüft. Im Mausmodell beträgt das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen in ruhenden Lymphknoten etwa 2 zu 1. Nach Auftragung von DNFB auf die Haut der Mäuse und einer dadurch ausgelösten primären DTH-Antwort, verschiebt sich dieses Verhältnis in Richtung CD8⁺ T-Zellen und beträgt ca. 1 zu 2. Diese DNFB-induzierte Verschiebung in Richtung CD8⁺ T-Zellen konnte in Baumwollratten bestätigt werden. In nicht-stimulierten Lymphozyten betrug das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen 1,5 zu 1 und in DNFB-stimulierten Zellen 1 zu 1,7. Im Mensch wird das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen in PBL durch eine Infektion mit MV nicht beeinflußt (Arneborn and Biberfeld, 1983). In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigte sich auch in Lymphknotenzellen von

Baumwollratten, daß das Verhältnis der T-Zellen durch MV nicht beeinflusst wurde; weder in nicht-stimulierten noch in DNFB-stimulierten Lymphknotenzellen.

In der primären DTH-Reaktion wurde die Anzahl der Lymphknotenzellen in drainierenden Lymphknoten des DNFB-behandelten Ohres durch MV nicht verändert. Außerdem zeigten DNFB-stimulierte Lymphozyten von infizierten und nicht-infizierten Baumwollratten eine verstärkte MHC I-Expression, ohne Unterschied der Expressionsstärke. Die starke MHC I-Expression war ein Zeichen der Immunaktivierung. Auf der anderen Seite war die Proliferation dieser DNFB-spezifischen T-Zellen reduziert und somit ein Zeichen der Immunsuppression. Diese Ergebnisse deuten zwar auf eine initiierte antigenspezifische T-Zellantwort, unabhängig von einer MV-Infektion, aber gleichzeitig auf eine MV-inhibierte Expansion der T-Zellen während der primären und sekundären T-Zellantwort.

Fraglich ist nach wie vor, wie die in dieser Arbeit beobachtete Inhibition der Proliferation in DNFB-stimulierten Lymphozyten MV-infizierter Tiere ausgelöst wird. Direkter Kontakt von Lymphozyten mit den MV-Glykoproteinen F und H führt aufgrund eines verzögerten Zellzyklus (McChesney et al., 1987; Schnorr et al., 1997; Naniche et al., 1999; Niewiesk et al., 1999 a) zu einer reduzierten Proliferation in Gewebekultur (Schlender et al., 1996) und in Baumwollratten (Niewiesk et al., 1997 a). Da aber kein infektiöses Virus in den Mandibular-Lymphknotenzellen durch Kokultivierung gefunden wurde (Daten nicht gezeigt), kann ein direkter Kontakt von F/H und Lymphozyten als Auslöser der Proliferationsinhibition ausgeschlossen werden.

Im Mausmodell wurde gezeigt, daß neben der immunsuppressiven Wirkung von F und H ebenfalls das Nukleokapsidprotein von MV immunsuppressiv wirkt. Durch Injektion des Nukleokapsidproteins (N-Protein) wird eine schwache Suppression der DTH-Reaktion ausgelöst. Ein UV-inaktiviertes rekombinantes MV (MGV), welches keine MV-Hüllproteine besitzt, aber noch über das N-Protein verfügt, induziert den gleichen Effekt (Marie et al., 2001). Mit Hilfe von RT-PCR-Analysen wurde N-mRNA von MV (Esolen et al., 1993) in PBL gefunden (1 bis 2 Lymphozyten auf 20000). Da das N-Protein von MV die Replikation von T-Zellen reduziert (Marie et al., 2001), ist es denkbar, daß die in dieser Arbeit beobachtete Inhibition der Proliferation durch eine unvollständige Replikation des MV mit Expression des N-Proteins ausgelöst wurde. Eine weitere Erklärung wären indirekte Regulationsmechanismen. Wie schon früher berichtet (Griffin et al., 1994), könnte eine Infektion der Lunge oder deren drainierende Lymphknoten zu indirekten Regulationsmechanismen der T-Zellproliferation führen. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, daß im Mausmodell der DTH-Reaktion eine intraperitoneale Injektion von UV-inaktiviertem MV bzw. MV-Nukleokapsidprotein zu einer leichten Reduktion der Ohrschwellung führt, obwohl sich die Einstichstelle an einer anderen Stelle befindet, als der Ort der T-Zellaktivierung (Marie et al., 2001). Die

Inhibition der T-Zellproliferation könnte auch durch Entwicklung einer TH2-Antwort induziert werden. Es wurde schon mehrfach berichtet, daß in Gewebekultur eine Infektion von DC mit MV zu einer Reduktion der IL-12-Sekretion nach Stimulation führt (Fugier-Vivier et al., 1997; Grosjean et al., 1997; Klagge et al., 2000). Da IL-12 die Entwicklung von TH1-Zellen fördert, könnte es durchaus sein, daß die Reduktion von IL-12 *in vivo* zur Entwicklung einer TH2-Antwort führt. Weiterhin wurde im Mausmodell der DTH-Reaktion gezeigt, daß in C57BL/6- und CD46-transgenen Mäusen die Anzahl an IL-12-sezernierenden DC 24 bzw. 48 Stunden nach Injektion von UV-inaktiviertem MV reduziert ist (Marie et al., 2001). Dies würde der Entwicklung einer TH2-Antwort entsprechen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde gezeigt, daß die Ausbildung einer primären und sekundären DTH-Antwort durch MV gehemmt wird. Bei der Untersuchung des Einflusses von MV auf die DNFB-spezifische T-Zellproliferation während der primären DTH-Antwort wurde eine Spontanproliferation der DNFB-unbehandelten Lymphozyten MV-infizierter Tiere im Vergleich zu Lymphozyten nicht-infizierter Baumwollratten ermittelt. Die Anzahl dieser Zellen war ebenfalls stark erhöht, sowie die Spontanproliferation in Milzzellen MV-infizierter Tiere. MV-infizierte Personen zeigen außerdem eine spontane Proliferation der PBL. Die beobachtete Spontanproliferation ist ein Hinweis für eine Immunaktivierung nach MV-Infektion, die sich parallel zur MV-induzierten Suppression der DTH-Antworten entwickelt.

Diese Annahme wird durch Induktion einer MV-spezifischen CD4⁺ T-Zellantwort (Dissertation von Karen Pueschel, 2001) und B-Zellantwort 12 Tage nach der Infektion gestützt (in dieser Arbeit gezeigt). Außerdem wird 6 Tage nach Infektion mit MV eine erhöhte lytische Aktivität der natürlichen Killerzellen beobachtet (Habilitationsschrift von Stefan Niewiesk, 2000). Gegensätzliche Beobachtungen sprechen allerdings für eine Reduktion der lytischen Aktivität (Griffin et al., 1990 b; diese Arbeit).

Eine mögliche Erklärung der simultanen Entstehung einer Suppression von DTH-Antworten und Immunaktivierung nach MV-Infektion ist die dreitägige Entwicklungsdauer der MV-induzierten Immunsuppression nach Infektion in Baumwollratten (Niewiesk et al., 1997 a; Niewiesk, 1999 b). Während dieser Zeit könnte sich eine MV-spezifische Immunantwort bilden. Nach Entstehung der Immunsuppression könnte es sein, daß die neu induzierte Immunantwort nicht mehr gestoppt werden kann, aber gleichzeitig keine Immunantwort mehr gegen Drittantigene, wie zum Beispiel DNFB, möglich ist. Die im Baumwollrattenmodell gewonnenen Ergebnisse sprechen für diese Hypothese.

6. Zusammenfassung

Im Rahmen dieser Dissertation wurde die Bedeutung der Glykoproteine Fusionsprotein (F) und Hämagglutinin (H) des Masernvirus (MV) für die MV-induzierte Immunsuppression analysiert. Die erhöhte Empfänglichkeit von MV-infizierten Kindern für Sekundärinfektionen wird auf die ausgeprägte Immunsuppression zurückgeführt, die während und noch Monate nach einer Infektion beobachtet wird. Isolierte periphere Blutlymphozyten (PBL) von MV-infizierten Personen zeigen in Gegenwart von Mitogenen eine stark reduzierte Proliferation *ex vivo*, die als Parameter für die Immunsuppression verwendet wird. Die Inhibition der Proliferation wird auf die viralen Glykoproteine F und H zurückgeführt und nur Wildtypviren sind in der Lage, eine klinisch relevante Immunsuppression auszulösen. Die Mechanismen, die dieser Immunsuppression zugrunde liegen, sind jedoch nicht vollständig geklärt.

Um den immunsuppressiven Effekt von F und H in einem genetisch und immunologisch gut charakterisiertem Tiermodell näher analysieren zu können, wurde in der vorliegenden Arbeit ein neues transgenes Mausmodell etabliert. Es wurde ein konditionell transgenes Mausmodell gewählt, in dem die für die Immunsuppression verantwortlichen MV-Glykoproteine eines Wildtypstammes gewebespezifisch und Tetrazyklin-regulierbar exprimiert wurden (Tet-System). Mit Hilfe der Mikroinjektion wurde eine auffällig kleine Anzahl an transgenen Tieren hergestellt. Aus 780 Mikroinjektionen gingen nur vier transgene Mäuse hervor, die F und H unter Kontrolle eines Transaktivator-abhängigen bidirektionalen Promotors in ihrem Genom enthielten. Dies war ein erster Hinweis für eine starke Selektion gegen die Expression von F und H in diesem Tiermodell. Die verschiedenen Mauslinien konnten in dieser Arbeit vollständig charakterisiert werden. Um auch einzelne Kopien des Transgens nachweisen zu können, wurde eine hochsensitive Genotypisierungs-PCR und ein sensitiver Southern-Blot etabliert. Es wurde gezeigt, daß eine der vier Mauslinien eine einzelne Kopie und die restlichen drei Linien ungefähr 10 Kopien in tandemartiger Anordnung in ihrem Genom enthielten. Zusätzlich konnte mit Southern-Blot-Analysen nachgewiesen werden, daß die Integration der Transgene in eine einzige Stelle des Genoms stattgefunden hatte.

Es wird angenommen, daß die geringe Anzahl an transgenen Mäusen auf eine schädliche Restexpression von F und H während der Embryogenese

zurückzuführen ist, und nur Tiere mit einer starken Expressionskontrolle des Transgens geboren wurden. Dies wird unterstützt durch die Tatsache, daß keine der vier transgenen Mauslinien eine Restexpression von F und H aufwies.

Bei der Kreuzung der Mäuse zu homozygoten Linien stellte sich heraus, daß eine Linie in homozygoter Form nicht züchtbar war. Es handelte sich wahrscheinlich um eine Insertionsmutante. Die restlichen drei Linien wurden mit T-Zell-spezifischen Induziermäusen gekreuzt, um doppelt-transgene Mäuse mit Tetrazyklin-regulierbarer Expression von F und H in T-Zellen herzustellen. Expressionsanalysen zeigten, daß in zwei doppelt-transgenen Linien das Transgen stumm blieb. In der letzten verbleibenden Linie konnte die Transkription von F- und H-mRNA in Milz (*in vitro*) und Thymus (*in vitro* und *in vivo*) nachgewiesen werden. Die Expression war allerdings so schwach, daß nur ein Tier eine leichte Produktion von H-Protein im Thymus aufwies. All diese Beobachtungen deuten auf eine starke Selektion gegen eine Expression von F und H.

In dem neu etablierten Mausmodell wurden die Auswirkungen der Expression von F und H *in vivo* überprüft. In einzelnen doppelt-transgenen Mäusen der induzierbaren Linie wurde eine schwache MV-spezifische B- und T-Zellantwort nachgewiesen. Allerdings konnte keine Immunsuppression induziert werden, und auch kein Einfluß der Glykoproteine auf die Thymozytenanzahl festgestellt werden. Weiterhin wurden durch eine Langzeit-Expression von F und H über 23 Wochen keine geringen immunsuppressiven Effekte kumulativ über die Zeit sichtbar. Diese geringen Auswirkungen werden auf die schwache Expression der MV-Glykoproteine F und H zurückgeführt. Mit Hilfe des in dieser Arbeit etablierten Mausmodells wurde gezeigt, daß die Expression der MV-Glykoproteine F und H einen starken toxischen Effekt auf Mäuse ausübt. Dieser toxische Effekt könnte bei der MV-induzierten Immunsuppression eine Rolle spielen.

In einem zweiten Teil dieser Dissertation wurde das in Mäusen aufgebaute kutane Hypersensitivitätsmodell mit Dinitrofluorobenzol (DNFB) in der Baumwollratte etabliert, um den Einfluß von MV auf die Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp (DTH-Reaktion) überprüfen zu können.

Um die Funktion der T-Zellen während der DTH-Reaktion in der Baumwollratte zu analysieren, wurde eine sekundäre Antwort gegen DNFB ausgelöst und die CD4⁺ oder CD8⁺ T-Zellen depletiert. Es stellte sich heraus, daß CD8⁺ T-Zellen als Haupteffektorzellen der DTH-Reaktion fungieren, ähnlich dem Mausmodell. Im Gegensatz dazu ist die Rolle der CD4⁺ T-Zellen eine andere, als in der Maus. In der Baumwollratte unterstützen diese Zellen die Funktion der CD8⁺ T-Zellen, anstatt die DNFB-spezifische CD8⁺ T-Zellantwort abzuschwächen.

In der Maus wird die sekundäre DTH-Antwort durch MV reduziert. Daher wurde der Einfluß von MV auf die primäre und sekundäre DTH-Reaktion im Baumwollrattenmodell überprüft. Es war bekannt, daß in der Baumwollratte die primäre DNFB-spezifische T-Zellproliferation durch MV während der akuten

Infektionsphase reduziert wird. Diese Beobachtung konnte in der vorliegenden Arbeit bestätigt werden. Weiterhin wurde gezeigt, daß das Virus nicht nur die primäre sondern auch die sekundäre DNFB-spezifische T-Zellantwort unterdrückt. Ebenso hemmt das Virus im Mensch die DTH-Reaktion gegen Tuberkulin. Somit korreliert die Beobachtung einer reduzierten DTH-Antwort in der MV-infizierten Baumwollratte sehr gut mit den Ergebnissen aus Untersuchungen an Menschen und Mäusen.

Um die DNFB-spezifische T-Zellantwort weiter zu charakterisieren, wurde das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen bestimmt. Im Mausmodell wird dieses Verhältnis durch DNFB-Stimulation in Richtung der CD8⁺ T-Zellen verschoben. Dieser Befund konnte in der Baumwollratte bestätigt werden. Im Mensch wird das Verhältnis von CD4⁺ zu CD8⁺ T-Zellen in PBL durch eine Infektion mit MV nicht beeinflußt. In Übereinstimmung mit diesem Ergebnis zeigte sich auch in Lymphknotenzellen von Baumwollratten, daß das Verhältnis der T-Zellen durch MV nicht beeinflußt wurde; weder in nicht-stimulierten noch in DNFB-stimulierten Lymphknotenzellen.

In der primären DTH-Reaktion war die Anzahl der Lymphknotenzellen in drainierenden Lymphknoten des DNFB-behandelten Ohres durch MV nicht verändert. Außerdem zeigten DNFB-stimulierte Lymphozyten von infizierten und nicht-infizierten Baumwollratten eine verstärkte MHC I-Expression, ohne Unterschied in der Expressionsstärke. Diese starke MHC I-Expression war ein Zeichen der Immunaktivierung, die parallel zur Inhibition der Proliferation DNFB-spezifischer T-Zellen beobachtet wurde. Diese Ergebnisse deuten zwar auf eine initiierte antigenspezifische T-Zellantwort, unabhängig von einer MV-Infektion, aber gleichzeitig auf eine MV-inhibierte Expansion der T-Zellen während der primären und sekundären T-Zellantwort

Es konnte gezeigt werden, daß neben der MV-induzierten Suppression von DTH-Antworten ebenfalls eine Aktivierung des Immunsystems durch MV stattfand. Es wurde eine Spontanproliferation von DNFB-unbehandelten Lymphozyten MV-infizierter Tiere während der primären DTH-Reaktion beobachtet, im Vergleich zu Lymphozyten nicht-infizierter Baumwollratten. Die Anzahl dieser Zellen war ebenfalls stark erhöht, sowie die Spontanproliferation in Milzzellen MV-infizierter Tiere. Es wurde die Hypothese aufgestellt, daß die dreitägige Entwicklungsdauer der MV-induzierten Immunsuppression in Baumwollratten die Ursache der simultanen Entstehung einer Immunsuppression und Immunaktivierung nach MV-Infektion ist. Während dieser Zeit könnte sich eine MV-spezifische Immunantwort bilden. Nach Entstehung der Immunsuppression könnte es sein, daß die neu induzierte Immunantwort nicht mehr gestoppt werden kann, aber gleichzeitig keine Immunantwort mehr gegen Drittantigene, wie zum Beispiel DNFB, möglich ist.

7. Summary

Due to the severe immune suppression induced during acute measles, infected children are highly susceptible to secondary infections. In contrast to vaccination, only infection with wildtype measles virus (MV) leads to clinically relevant immune suppression. After mitogen stimulation, isolated peripheral blood lymphocytes (PBL) of MV infected patients show a significant reduction of proliferation *ex vivo* which is used as a parameter for immune suppression. There is some evidence that the inhibition of lymphocyte proliferation is induced by the glycoproteins fusion protein (F) and hemagglutinin (H). However, the underlying mechanisms are not fully understood. The aim of this project was to analyze the influence of MV glycoproteins H and F on MV induced immune suppression.

In order to investigate the immune suppressive effect of F and H in a genetically and immunologically well characterized animal model, a novel transgenic mouse model was established. In this transgenic mouse the MV wildtype glycoproteins which are responsible for the immune suppression were conditionally expressed in a tissue specific and tetracycline-regulated manner (tet-system). Using microinjection, a remarkably small number of transgenic mice was produced. 780 microinjections resulted in only four transgenic mice containing F and H under the control of a transactivator-dependent bidirectional promoter in their genome. This was a first hint at a strong selection against the expression of F and H in the transgenic animal model.

The various mouse lines were fully characterized. To detect single copies of the transgene, a highly sensitive PCR and southern blot were established. It could be shown that one of the four mouse lines contained a single copy of the transgene, whereas the three remaining lines had approximately 10 copies in a tandem-arrangement in the genome. In addition, southern blotting revealed that the integration of the transgenes had occurred at a single location in the genome.

Presumably, the small number of transgenic mice was due to leaky expression of F and H during embryogenesis which in consequence lead to animals with a strong control of the expression of the transgene. This is in line with the result that none of the four transgenic mouse lines showed a residual expression of F and H.

Of the four lines obtained, one line bred insufficiently well to obtain a homozygous line possibly due to an insertion mutant. The remaining three lines were crossed

with an inducer mouse which expressed the tetracycline-responsive transactivator in a T cell specific manner as to produce double-transgenic mice with tetracycline-regulated expression of F and H in T cells. Expression analysis revealed that the transgene was silent in two double-transgenic lines. In the remaining line, the transcription of F- and H-mRNA in spleen (*in vitro*) and thymus (*in vitro* and *in vivo*, respectively) could be detected. However, protein expression was rather weak and H protein was found in the thymus of only one animal. In summary, these observations hint at a strong selection against an expression of F and H.

In these mice the effect of the expression of F and H were investigated. In some of the double-transgenic mice of the inducible line, a weak MV specific B and T cell response could be detected. However, no immune suppression was induced and no decrease in the number of thymocytes was observed. Furthermore, even in the context of a long-term expression of F and H over a period of 23 weeks, no cumulative immune suppressive effects could be detected after infection with a murine leukemia virus. This appears to be a result of the weak expression of the MV glycoproteins F and H due to their toxic effect *in vivo*.

Apparently, in this mouse model the toxic effect of MV glycoprotein expression downregulated the expression of these proteins. Thus it might be that this toxic effect may be important in the context of MV induced immune suppression.

The second part of the thesis was directed to the transfer of the cutaneous hypersensitivity model based on dinitrofluorobenzene (DNFB) known from mice to cotton rats in order to elucidate the influence of MV on delayed type hypersensitivity reactions (DTH).

To analyze the function of T cells during DTH reactions in the cotton rat, a secondary DNFB response was generated and CD4⁺ or CD8⁺ T cells were depleted. It was found that - similar to the mouse - CD8⁺ T cells represent the main effector cells in DTH reactions. In contrast, rather than down regulating the DNFB specific CD8⁺ T cell response as in the mouse, the role of CD4⁺ T cells in cotton rats seems to deviate in that they appear to support the function of CD8⁺ T cells.

In the mouse, MV reduces the secondary DTH response. Therefore, the effect of MV on primary and secondary DTH reactions was studied in the cotton rat model. It is well-known from the literature that in cotton rats the primary DNFB specific T cell proliferation is reduced by MV during the acute phase of the infection. This could be confirmed in the present work. Moreover, it was found that the virus reduces the secondary DNFB specific T cell response as well. Furthermore, it is known that MV suppresses the DTH reaction against tuberculin in humans. Therefore, the result of a reduced DTH response in MV infected cotton rats correlates well with results of studies on humans and mice.

In order to further characterize the DNFB specific T cell response, the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T cells was determined. In mice, this ratio is shifted towards CD8⁺ T cells

after DNFB stimulation. This finding could be confirmed in cotton rats. Moreover, an infection with MV does not influence the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in PBL in humans. Again, this finding could be confirmed in cotton rats, with no influence of MV on the ratio of CD4⁺ and CD8⁺ T cells in not activated or DNFB stimulated lymph node cells, respectively.

In the primary DTH reaction, the number of lymphocytes in lymph nodes draining DNFB treated ears was not altered by MV. Moreover, DNFB stimulated lymphocytes of infected and non-infected cotton rats showed a similarly increased expression of MHC I. This strong expression of MHC I is related to immune activation that was observed in parallel to the inhibition of proliferation of DNFB specific T cells. These data indicate that the antigen specific T cell response was initiated, independent on a MV infection, but also the expansion of T cells during both the primary and secondary T cell responses were inhibited after MV infection.

In addition to the MV induced suppression of DTH responses, an activation of the immune system induced by MV was observed. Compared to lymphocytes of non-infected cotton rats, MV infected animals showed a spontaneous proliferation of lymphocytes from the DNFB-untreated ear during the primary DTH reaction. Moreover, the number of these lymphocytes and the spontaneous proliferation in spleen cells of infected animals was drastic increased. The duration of the development of MV induced immune suppression of three days in cotton rats might be a potential explanation for the simultaneous development of immune suppression and immune activation after MV infection. Assuming the generation of an MV specific immune response during this period, it might be that the newly induced immune response cannot be inhibited after immune suppression has developed whereas simultaneously, no immune response against third antigens such as DNFB can be induced.

Literaturverzeichnis

Alkhatib, G., and D. J. Briedies. *The predicted primary structure of the measles virus hemagglutinin*. *Virology*, 1986; 150: 479-490

Arneborn, P. and G. Biberfeld. *T-lymphocyte subpopulations in relation to immunosuppression in measles and varicella*. *Infect. Immun.*, 1983; 39: 29-37

Auwaerter, P. G., P. A. Rota, W. R. Elkins, R. J. Adams, T. DeLozier, Y. Shi, W. J. Bellini, B. R. Murphy and D. E. Griffin. *Measles virus infection in rhesus macaques: altered immune responses and comparison of the virulence of six different virus strains*. *J. Infect. Dis.*, 1999; 180: 950-958

Avota, E., A. Avots, S. Niewiesk, L. Kane, U. Bommhardt, V. ter Meulen and S. Schneider-Schaulies. *Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus*. *Nature Med.*, 2001; 7: 725-731

Baker, K. A., R. E. Dutch, R. A. Lamb and T. S. Jardetzky. *Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion*. *Mol. Cell*, 1999; 3: 309-319

Barnstable, C. J., W. F. Bodmer, G. Brown, G. Galfre, C. Milstein, A. F. Williams and A. Ziegler. *Production of monoclonal antibodies to group A erythrocytes, HLA and other human cell surface antigens – new tools for genetic analysis*. *Cell*, 1978; 14: 9-20

Baron, U., M. Gossen and H. Bujard. *Tetracycline-controlled transcription in eukaryotes: novel transactivators with graded transactivation potential*. *Nucl. Acids. Res.*, 1995; 25: 2723-2729

Black, J. B., E. Durigon, K. Kite-Powell, L. de Souza, S. P. Curli, A. M. Afonso and M. Theobaldo. *Seroconversion to human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 among brazilian children with clinical diagnoses of measles or rubella*. *Clin. Infect. Dis.*, 1996; 23: 1156-1158

Blixenkron-Möller, M., A. Bernard, A. Bencsik, N. Sixt, L. E. Diamond, J. S. Logan and T. F. Wild. *Role of CD46 in measles virus infection in CD46 transgenic mice*. *Virology*, 1998; 249: 238-248

Boer, J., A. Williams, G. Skavdis, N. Harker, M. Coles, M. Tolaini, T. Norton, K. Williams, K. Roderick, A. J. Potocnik and D. Kioussis. *Transgenic mice with hematopoietic and lymphoid specific expression of Cre*. *Eur. J. Immunol.*, 2003; 33: 314-325

Bolt, G., and I. R. Pedersen. *The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types*. *Virology*, 1998; 252: 387-398

Bour, H., E. Peyron, M. Gaucherand, J.-L. Garrigue, C. Desvignes, D. Kaiserlian, J.-P. Revillard and J.-F. Nicolas. *Major histocompatibility complex class I-restricted CD8⁺ T cells and class II-restricted CD4⁺ T cells, respectively, mediate and regulate contact sensitivity to dinitrofluorobenzene*. *Eur. J. Immunol.*, 1995; 25: 3006-3010

- Bujard, H. *Controlling gene activities via the Tet regulatory systems: A Trouble Shooting Guide*. <http://www.zmbh.uni-heidelberg.de/Bujard/trouble/printingver.html>, 1996; p. 1-4
- Burnstein, T., J. H. Jensen and B. H. Waksman. *The development of a neurotropic strain of measles virus in hamsters and mice*. J. Infect. Dis., 1963; 113: 265-272
- Byrd, L. G. and G. A. Prince. *Animal models of respiratory syncytial virus infection*. Clin. Infect. Dis., 1997; 25: 1363-1368
- Chesebro, B., K. Wehrly and J. Stimpfling. *Host genetic control of recovery from Friend leukemia virus-induced splenomegaly. Mapping of a gene within the major histocompatibility complex*. J. Exp. Med., 1974; 140: 1457-1467
- Choi, T., M. Huang, C. Gorman and R. Jaenisch. *A Generic Intron Increases Gene Expression in Transgenic Mice*. Mol. Cell. Biol., 1991; 11: 3070-3074
- Chow, Y.-Hua, J. Plumb, Y. Wen, B. M. Steer, Z. Lu, M. Buchwald and J. Hu. *Targeting Transgene Expression to Airway Epithelia and Submucosal Glands, Prominent Sites of Human CFTR Expression*. Molecular Therapy, 2000; 2: 359-367
- Clements, C. J. and F. T. Cutts. *The epidemiology of measles: thirty years of vaccination*. Curr. Top. Microbiol. Immunol., 1995; 191: 13-33.
- Cosby, S. L., W. P. Duprex, L. A. Hamill, M. Ludlow and S. McQuaid. *Approaches in the understanding of morbillivirus neurovirulence*. J. Neurovirol., 2002; 2: 85-90
- Costantini, F., G. Radice, J. L. Lee, K. Chada, W. Perry and H. J. Son. *Insertional mutations in transgenic mice*. Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol., 1989; 36: 159-169
- Delespesse, G., C. E. Demeure, L. P. Yang, Y. Ohshima, D. G. Byun and U. Shu. *In vitro maturation of naive human CD4⁺ T lymphocytes into Th1, Th2 effectors*. Int. Arch. Allergy. Immunol., 1997; 113: 157-159
- Desvignes, C., H. Bour, J. F. Nicolas and D. Kaiserlian. *Lack of oral tolerance but oral priming for contact sensitivity to dinitrofluorobenzene in major histocompatibility complex class II-deficient mice and in CD4⁺ T cell-depleted mice*. Eur. J. Immunol., 1996; 26: 1756-1761
- Dittmer, U., D. M. Brooks and K. J. Hasenkrug. *Characterization of a Live-Attenuated Retroviral Vaccine Demonstrates Protection via Immune Mechanisms*. J. Virol., 1998; 72: 6554-6558
- Doerig, R. E., A. Marcil, A. Chopra and C. D. Richardson. *The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain)*. Cell, 1993; 75: 295-305
- Engelking, O., L. M. Fedorov, R. Lilischkis, V. ter Meulen and S. Schneider-Schaulies. *Measles virus-induced immunosuppression in vitro is associated with deregulation of G1 cell cycle control proteins*. J. Gen. Virol., 1999; 80: 1599-1608
- Erlenhoef, C., W. J. Wurzer, S. Löffler, S. Schneider-Schaulies, V. ter Meulen and J. Schneider-Schaulies. *CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition*. J. Virol., 2001; 75: 4499-4505
- Erlenhoef, C., W. P. Duprex, B. K. Rima, V. ter Meulen and J. Schneider-Schaulies. *Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus*. J. Gen. Virol., 2002; 83: 1431-1436

- Esolen, L. M., B. J. Ward, T. R. Moench and D. E. Griffin. *Infection of monocytes during measles*. J. Infect. Dis., 1993; 168: 47-52
- Faith, R. E., C. A. Montgomery, W. J. Durfee, E. Aguilar-Cordova and P. R. Wyde. *The cotton rat in biomedical research*. Laboratory Animal Science, 1997; 47: 337-345
- Fedorov, L. M., O. Y. Tyrsin, O. Sakk, A. Ganscher and U. R. Rapp. *Generation Dependent Reduction of tTA Expression in Double Transgenic NZL-2/tTACMV Mice*. Genesis, 2001; 31: 78-84
- Fireman, P., G. Friday and J. Kumate. *Effect of measles vaccine on immunologic responsiveness*. Pediatrics, 1969; 43: 264-272
- Forth, W., D. Henschler and W. Rummel. In *Allgemeine und spezielle Pharmakologie und Toxikologie*. Wissenschaftsverlag, 1987; p. 639-640
- Fugier-Vivier, I., C. Servet-Delphrat, P. Rivallier, M. C. Rissoan, Y. J. Liu and C. Rabourdin-Combe. *Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells*. J. Exp. Med., 1997; 186: 813-823
- Gerlier, D., B. Loveland, G. Varior-Krishnan, B. Thorley, I. McKenzie and C. Rabourdin-Combe. *Measles virus receptor properties are shared by several CD46 isoforms differing in extracellular regions and cytoplasmic tails*. J. Gen. Virol., 1994; 75: 2163-2171
- Gombart, A. F., A. Hirano and T. C. Wong. *Conformational maturation of measles virus nucleocapsid protein*. J. Virol., 1993; 67: 4133-4141
- Gossen, M. and H. Bujard. *Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1992; 89: 5547-5551
- Gossen, M., S. Freundlieb, G. Bender, G. Mueller, W. Hillen and H. Bujard. *Transcriptional activation by tetracycline in mammalian cells*. Science, 1995; 268: 1766-1769
- Griffin, D. E., J. Mullinx, O. Narayan and R. T. Johnson. *Age dependence of viral expression: comparative pathogenesis of two rodent-adapted strains of measles virus in mice*. Infect. Immun., 1974; 9: 690-695
- Griffin, D. E., B. J. Ward, E. Jauregui, R. T. Johnson and A. Vaisberg. *Immune activation during measles: interferon-gamma and neopterin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease*. J. Infect. Dis., 1990 a; 161: 449-453
- Griffin, D. E., B. J. Ward, E. Jauregui, R. T. Johnson and A. Vaisberg. *Natural killer cell activity during measles*. Clin. Exp. Immunol., 1990; 81: 218-224
- Griffin, D. E. and B. J. Ward. *Differential CD4 T cell activation in Measles*. J. Infect. Dis., 1993; 168: 275-281
- Griffin, D.E., B. J. Ward and L. M. Esolen. *Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune responses*. J. Infect. Dis., 1994; 170: 24-31
- Griffin, D. E. *Immune responses during measles virus infection*. In *Measles virus*, M. Billeter and V. ter Meulen, Editors. 1995, Springer, Berlin; p. 117-134
- Griffin, D. E. and W. J. Bellini. *Mesles Virus*. In *Virology*, B. N. Fields, D. M. Knipe and P. M. Howley, Editors. 1996, Lippincott-Raven, Philadelphia;. p. 1267-1312

- Grosjean, I., C. Caux, C. Bella, I. Berger, F. Wild, J. Banchereau and D. Kaiserlian. *Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4⁺ T cells*. J. Exp. Med., 1997; 186: 801-812
- Hammes, A. and A. Schedl. *Generation of transgenic mice from plasmids, BACs and YACs*. In *Mouse Genetics and Transgenics*, I. J. Jackson and C. M. Abbott. 2000, Oxford University Press; p. 217-245
- Hasenkrug, K. J. *Lymphocyte Deficiencies Increase Susceptibility to Friend Virus-Induced Erythroleukemia in Fv-2 Genetically Resistant Mice*. J. Virol., 1999; 73: 6468-6473
- Hasenkrug, K. J. and U. Dittmer. *The Role of CD4 and CD8 T Cells in Recovery and Protection from Retroviral Infection: Lessons from the Friend Virus Model*. Virology, 2000; 272: 244-249
- Hashimoto, K., N. Ono, H. Tatsuo, H. Minagawa, M. Takeda, K. Takeuchi and Y. Yanagi. *SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein*. J. Virol., 2002; 76: 6743-6749
- Hillen, W. and C. Berens. *Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance*. Annu. Rev. Microbiol., 1994; 48: 345-369
- Hillen, W. and A. Wissmann. In *Protein-Nucleic Acid Interaction, Topics in Molecular and Structural Biology*, Saenger, W. and U. Heinemann (Macmillan, London), 1989; 10: 143-162
- Horvath, B., P. Rivaille, G. Varior-Krishnan, A. Cardoso, D. Gerlier and C. Rarourdin-Combe. *Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infections*. J. Virol., 1996; 70: 6673-6681
- Hsu, E. C., C. Iorio, F. Sarangi, A. A. Khine and C. D. Richardson. *CDw150 (SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus*. Virology, 2001; 279: 9-21
- <http://www.med.umich.edu/tamc/spike.html>
- Hussey, G. D., E. A. Goddard, J. Hughes, J. J. Ryon, M. Kerran, E. Carelse, P. M. Strebel, L. E. Markowitz, J. Moodie, P. Barron, Z. Latief, R. Sayed, D. Beatty and D. E. Griffin. *The effect of Edmonston-Zagreb and Schwarz measles vaccines on immune response in infants*. J. Infect. Dis., 1996; 173: 1320-1326
- Ilonen, J., R. Salonen, R. Marusyk and A. Salmi. *Measles virus strain-dependent variation in outcome of infection of human blood mononuclear cells*. J. Gen. Virol., 1988; 69: 247-252
- Johnston, I. C. D., V. ter Meulen, J. Schneider-Schaulies and S. Schneider-Schaulies. *A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism*. J. Virol., 1999; 73: 6903-6915
- Karp, C. L. *Measles: immunosuppression, interleukin-12, and complement receptors*. Immunol. Rev., 1999; 168: 91-101
- Katz, M. *Clinical Spectrum of measles*. In *Measles virus*, M. Billeter and V. ter Meulen, Editors. 1995, Springer, Berlin; p. 1-12

- Kehren, J., C. Desvignes, M. Krasteva, M.-T. Ducluzeau, O. Assossou, F. Horand, M. Hahne, D. Kägi, D. Kaiserlian and J.-F. Nicolas. *Cytotoxicity Is Mandatory for CD8⁺ T Cell-mediated Contact Hypersensitivity*. *J. Exp. Med.*, 1999; 189: 779-786
- Kistner, A., M. Gossen, F. Zimmermann, J. Jerecic, C. Ullmers, H. Luebbert and H. Bujard. *Doxycycline-mediated quantitative and tissue-specific control of gene expression in transgenic mice*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1996; 93: 10933-10938
- Klagge, I. M., V. ter Meulen and S. Schneider-Schaulies. *Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface*. *Eur. J. Immunol.*, 2000; 30: 2741-2750
- Kobune, F., H. Takahashi, K. Terao, T. Ohkawa, Y. Ami, Y. Suzaki, N. Nagata, H. Sakata, K. Yamanouchi and C. Kai. *Nonhuman primate models of measles*. *Lab. Anim. Sci.*, 1996; 46: 315-320
- Koplik, H. *The diagnosis of the invasion of measles from a study of exanthema as it appears on the buccal mucous membrane*. *Arch. Pediatr.*, 1896; 12: 918-920
- Kozak, M. *An analysis of 5'-noncoding sequences from 699 vertebrate messenger RNAs*. *Nucleic Acids Res.*, 1987; 15: 8125-8148
- Legname, G., B. Seddon, M. Lovatt, P. Tomlinson, N. Sarner, M. Tolaini, K. Williams, T. Norton, D. Kioussis and R. Zamoyska. *Inducible Expression of a p56Lck Transgene Reveals a Central Role for Lck in the Differentiation of CD4 SP Thymocytes*. *Immunity*, 2000; 12: 537-546
- Leopardi, R., J. Ilonen, L. Mattila and A. A. Salmi. *Effect of measles virus infection on MHC class II expression and antigen presentation in human monocytes*. *Cell. Immunol.*, 1993; 147: 388-396
- Liebert, U. G. and V. ter Meulen. *Virological aspects of measles virus induced encephalomyelitis in Lewis and BN rats*. *J. Gen. Virol.*, 1987; 68: 1715-1722
- Liebert, U. G., S. Schneider-Schaulies, K. Baczko and V. ter Meulen. *Antibody-induced restriction of viral gene expression in measles encephalitis in rats*. *J. Virol.*, 1990; 64: 706-713
- Liszewski, M. K., T. W. Post and J. P. Atkinson. *Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster*. *Annu. Rev. Immunol.*, 1991; 9: 431-455
- Lo, C. W., M. Coulling and C. Kirby. *Tracking of mouse cell lineage using microinjected DNA sequences: analyses using genomic Southern blotting and tissue-section in situ hybridizations*. *Differentiation*, 1987; 35: 37-44
- Lund, G. A., D. L. Tyrrell, R. D. Bradley and D. G. Scraba. *The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids*. *J. Gen. Virol.*, 1984; 65: 1535-1542
- Marie, J. C., J. Kehren, M.-C. Trescol-Biemont, A. Evlashev, H. Valentin, T. Walzer, R. Tedone, B. Loveland, J.-F. Nicolas, C. Roubardin-Combe and B. Horvat. *Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune responses*. *Immunity*, 2001; 14: 69-79
- Manchester, M., M. K. Liszewski, J. P. Atkinson and M. B. A. Oldstone. *Multiple isoforms of CD46 (membrane cofactor protein) serve as receptors for measles virus*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1994; 91: 2161-2165

- McChesney, M. B., J. H. Kehrl, A. Valsamakis, A. S. Fauci and M. B. Oldstone. *Measles virus infection of B lymphocytes permits cellular activation but blocks progression through the cell cycle*. J. Virol., 1987; 61: 3441-3447
- McChesney, M. B., A. Altmann and M. B. A. Oldstone. *Suppression of T lymphocyte function by measles virus is due to cell cycle arrest in G1*. J. Virol., 1988; 140: 1269-1273
- Modlin, J. F., J. T. Jabbour, J. J. Witte and N. A. Halsey. *Epidemiologic studies of measles, measles vaccine, and subacute sclerosing panencephalitis*. Pediatrics., 1977; 59: 505-512
- Modrow, S., D. Falke and U. Truyen. In *Molekulare Virologie*. Spektrum, 2003; p. 266
- Morley, D. *Severe measles in the tropics*. I. Br. Med. J., 1969; 1: 297-300
- Mrkic, B., J. Pavlovic, T. Rulicke, P. Volpe, C. J. Buchholz, D. Hourcade, J. P. Atkinson, A. Aguzzi and R. Cattaneo. *Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice*. J. Virol., 1998; 72: 7420-7427
- Nakamura, T., Y. Kamogawa, K. Bottomly and R. A. Flavell. *Polarization of IL-4- and IFN-gamma-producing CD4+ T cells following activation of naive CD4+ T cells*. J. Immunol., 1997; 158: 1085-1094
- Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Roubardin-Combe and D. Gerlier. *Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus*. J. Virol., 1993; 67: 6025-6032
- Naniche, D., S. I. Reed and M. B. Oldstone. *Cell cycle arrest during measles virus infection: a G0-like block leads to suppression of retinoblastoma protein expression*. J. Virol., 1999; 73: 1894-1901
- Niewiesk, S., U. Brinckmann, B. Bankamp, S. Sirak, U. G. Liebert and V. ter Meulen. *Susceptibility to measles virus-induced encephalitis in mice correlates with impaired antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes*. J. Virol., 1993; 67: 75-81
- Niewiesk, S., I. Eisenhuth, A. Fooks, J. C. Clegg, J. J. Schnorr, S. Schneider-Schaulies and V. ter Meulen. *Measles virus-induced immune suppression in the cotton rat (Sigmodon hispidus) model depends on viral glycoproteins*. J. Virol., 1997 a; 71: 7214-7219
- Niewiesk, S., J. Schneider-Schaulies, H. Ohnimus, C. Jassoy, S. Schneider-Schaulies and V. ter Meulen. *CD46 expression does not overcome the intracellular block of measles virus replication in transgenic rats*. J. Virol., 1997 b; 71: 7969-7973
- Niewiesk, S., F. Völp and V. ter Meulen. *A maintenance and handling device for cotton rats (Sigmodon hispidus)*. Lab. Animal, 1997 c; 26: 32-33
- Niewiesk, S., H. Ohnimus, J. J. Schnorr, M. Götzelmann, S. Schneider-Schaulies, C. Jassoy and V. ter Meulen. *Measles virus induced immunosuppression in cotton rats is associated with a cell cycle retardation in uninfected lymphocytes*. J. Gen. Virol., 1999 a; 80: 2023-2029
- Niewiesk, S. *Cotton rats (sigmodon hispidus): an animal model to study the pathogenesis of measles virus infection*. Immunology Letters, 1999 b; 65: 47-50
- Niewiesk, S., M. Goetzelmann and V. ter Meulen. *Selective in vivo suppression of T lymphocyte responses in experimental measles virus infection*. Proc. Natl. Acad. Sci., 2000; 97: 4251-4255

Niewiesk, S. and P. G. Germann. *Development of neutralizing antibodies correlates with resolution of interstitial pneumonia after measles virus infection in cotton rats*. J. Exp. Anim. Sci., 2000; 40: 201-210

Niewiesk, S., Habilitation, Würzburg 2000

Nussbaum, O., C. C. Broder, B. Moss, L. B. Stern, S. Rozenblatt and E. A. Berger. *Functional and structural interactions between measles virus hemagglutinin and CD46*. J. Virol., 1995; 69: 3341-3349

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

Palmiter, R. D. and R. L. Brinster. *Germ-line transformation of mice*. Annu. Rev. Genet., 1986; 20: 465-499

Palmiter, R. D., E. P. Sandgren, M. R. Avarbock, D. D. Allen and R. L. Brinster. *Heterologous introns can enhance expression of transgenes in mice*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 1991; 88: 478-482

Paludan, S. R. *Interleukin-4 and interferon-gamma: the quintessence of a mutual antagonistic relationship*. Scand. J. Immunol., 1998; 48: 459-468

Pauksen, K., J. Sjölin, A. Linde, G. Alm, B. Andersson, G. Lonnerholm and P. Ljungman. *Th1 and Th2 cytokine responses after measles antigen stimulation in vitro in bone marrow transplant patients: response to measles vaccination*. Bone Marrow Transplant., 1997; 20: 317-323

Persons, D. A., R. F. Peulson, M. R. Loyd, M. T. Herley, S. M. Bodner, A. Bernstein, P. H. Correll and P. A. Ney. *Fv2 encodes a truncated form of the Stk receptor tyrosine kinase*. (see comments), Nat. Genet., 1999; 23: 159-165

Pfeuffer, J., K. Püeschel, V. ter Meulen, J. Schneider-Schaulies and S. Niewiesk. *Extent of measles virus spread and immune suppression differentiates between wild-type and vaccine strains in the cotton rat model (Sigmodon hispidus)*. J. Virol., 2003; 77: 150-158

Pfeuffer, J., Dissertation, Würzburg 2002

Pirquet, v., C. *Das Verhalten der kutanen Tuberkulin-Reaktion während der Masern*. Dt. Med. Wochenschr., 1908; 34: 1297-1300

Polack, F. P., P. G. Auwaerter, S.-H. Lee, H. C. Nousari, A. Valsamakis, K. M. Leiferman, A. Diwan, R. J. Adams and D. E. Griffin. *Production of atypical measles in rhesus macaques: evidence for disease mediated by immune complex formation and eosinophils in the presence of fusion-inhibiting antibody*. Nat. Med., 1999; 5:629-634

Püeschel, K., Dissertation, Leipzig 2001

Rager-Zisman, B., J. E. Egan, Y. Kress and B. R. Bloom. *Isolation of cold-sensitive mutants of measles virus from persistently infected murine neuroblastoma cells*. J. Virol., 1984; 51: 845-855

- Rall, G. F., M. Manchester, L. R. Daniels, E. M. Callahan, A. R. Belman and M. B. Oldstone. *A transgenic mouse model for measles virus infection of the brain*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1997; 94: 4659-4663
- Ray, P., W. Tang, P. Wang, R. Homer, C. Kuhn, R. A. Flavell and J. A. Elias. *Regulated Overexpression of Interleukin 11 in the Lung*. Journal of Clinical Investigation, 1997; 100: 2501-2511
- Richardson, C., D. Hull, P. Greer, K. Hasel, A. Berkovich, G. Englund, W. Bellini, B. Rima and R. Lazzarini. *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, 1986; 155: 508-523
- Riley, E. C., G. Murphy and R. L. Riley. *Airborne spread of measles in a suburban elementary school*. Am. J. Epidemiol., 1978; 107: 421-432
- Ross, R. P., M. C. Graves, R. L. Wollmann, R. R. Chilcote and J. Nixon. *Immunologic and virologic studies of measles inclusion body encephalitis in an immunosuppressed host: the relationship to subacute sclerosing panencephalitis*. Neurology, 1981; 31: 1263-1270
- Sanchez-Lanier, M., P. Guerlin, L. C. McLaren and A. D. Bankhurst. *Measles-induced suppression of lymphocyte proliferation*. Cell. Immunol., 1988; 116: 367-381
- Schlender, J., J. J. Schnorr, T. Cattomen, R. Cattaneo, M. A. Billeter, V. ter Meulen and S. Schneider-Schaulies. *Surface interactions of measles virus glycoproteins is necessary and sufficient for the induction of proliferative inhibition of human peripheral blood mononuclear cells*. Proc. Natl. Acad. Sci., 1996; 93: 13194-13199
- Schlereth, B., P. G. Germann, V. ter Meulen and S. Niewiesk. *DNA vaccination with both the haemagglutinin and fusion proteins but not the nucleocapsid protein protects against experimental measles virus infection*. J. Gen. Virol., 2000; 81: 1321-1325
- Schneider-Schaulies, S., U. G. Liebert, Y. Segev, B. Rager-Zisman, M. Wolfson and V. ter Meulen. *Antibody-dependent transcriptional regulation of measles virus in persistently infected neural cells*. J. Virol., 1992; 66: 5534-5541
- Schneider-Schaulies, J., L. M. Dunster, F. Kobune, B. Rima and V. ter Meulen. *Differential downregulation of CD46 by measles virus strains*. J. Virol., 1995 a; 69: 7257-59
- Schneider-Schaulies, J., J. – J. Schnorr, U. Brinckmann, L. M. Dunster, K. Bacsko, U. G. Liebert, S. Schneider-Schaulies and V. ter Meulen. *Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild type and vaccine strain*. Proc. Nat. Acad. Sci., 1995 b; 92: 3943-3947
- Schnorr, J.-J., M. Seufert, J. Schlender, J. Borst, I. C. D. Johnson, V. ter Meulen and S. Schneider-Schaulies. *Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression in vitro*. J. Gen. Virol., 1997; 78: 3217-3226
- Spielhofer, P., T. Baechi, T. Fehr, G. Christiansen, R. Cattaneo, K. Kaelin, M. A. Billeter and H. Y. Naim. *Chimeric measles viruses with a foreign envelope*. J. Virol., 1998; 72: 2150-2159
- Streif, S., K. Pueschel, A. Tietz, J. Blanco, V. ter Meulen and S. Niewiesk. *Effector CD8⁺ T Cells are Suppressed by Measles Virus Infection during Delayed Type Hypersensitivity Reaction*. Viral Imm., 2004; 17: 604-608

Suryanarayana, K., K. Baczko, V. ter Meulen and R. R. Wagner. *Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue*. J. Virol., 1994; 68: 1532-1543

Tamashiro, V. G., H. H. Perez and D. E. Griffin. *Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during complicated and uncomplicated measles*. Pediatr. Infect. Dis., 1987; 6: 451-454

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

Triezenberg, S. J., R. C. Kingsbury and S. L. McKnight. *Functional dissection of VP16, the transactivator of herpes simplex virus immediate early gene expression*. Genes Dev., 1988; 2: 718-729

van Binnendijk, R. S., R. W. J. van der Heijden and A. D. M. E. Osterhaus. *Monkeys in measles research*. In *Measles Virus*, M. Billeter and V. ter Meulen, Editors. 1995, Springer, Berlin; p. 135-148

Varior-Krishnan, G., M.-C. Trescol-Biemont, D. Naninche, C. Rabourdin-Combe and C. Gerlier. *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., 1994; 68: 7891-7899

Varsanyi, T. M., H. Jörnvall and E. Norrby. *Isolation and characterization of the measles virus F1 polypeptide: comparison with other paramyxovirus fusion proteins*. Virology, 1985; 147: 110-117

Ward, B. J., R. T. Johnson, A. Vaisberg, E. Jauregui and D. E. Griffin. *Spontaneous proliferation of peripheral mononuclear cells in natural measles virus infection: identification of dividing cells and correlation with mitogen responsiveness*. Clin. Immunol. Immunopathol., 1990; 55: 315-326

Ward, B. J., R. T. Johnson, A. Vaisberg, E. Jauregui and D. E. Griffin. *Cytokine production in vitro and the lymphoproliferative defect of natural measles virus infection*. Clin. Immunol. Immunopathol., 1991; 61: 236-248

Weinmann, P., M. Gossen, W. Hillen, H. Bujard and C. Gatz. *A chimeric transactivator allows tetracycline-responsive gene expression in whole plants*. Plant. J., 1994; 5: 559-569

World Health Report, 1999

Wyde, P. R., M. W. Ambrose, T. G. Voss, H. L. Meyer and B. E. Gilbert. *Measles virus replication in lungs of hispid cotton rats after intranasal inoculation*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1992; 201: 80-87

Wyde, P. R., D. K. Moore-Poveda, N. J. Daley and H. Oshitani. *Replication of clinical measles virus strains in hispid cotton rats*. Proc. Soc. Exp. Biol. Med., 1999; 221: 53-62

Yanagi, Y., B. Cubitt and M. B. A. Oldstone. *Measles virus inhibits mitogen-induced T cell proliferation but does not directly perturb the T cell activation process inside the cell*. Virology, 1992; 187: 280-289

Ye, L., S. Chan, Y.-H. Chow, L.-C. Tsui and J. Hu. *Regulated Expression of the Human CFTR Gene in Epithelial Cells*. Molecular Therapy, 2001; 3: 723-733

Zhu, Y., G. Fennelly, C. Miller, R. Tarara, I. Saxe, B. Bloom and M. McChesney. *Recombinant Bacille Calmette-Guérin expressing the measles virus nucleoprotein protects infant Rhesus macaques from measles virus pneumonia.* J. Inf. Dis., 1997; 176: 1445-1453

Zhumabekov, T., P. Corbella, M. Tolaini and D. Kioussis. *Improved version of a human CD2 minigene based vector for T cell-specific expression in transgenic mice.* J. Immunol. Methods, 1995; 185: 133-140

Abkürzungsverzeichnis

AD	VP16-Aktivierungsdomäne von Herpes simplex
ATV	Adjusted Trypsin Versene
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
CD	Cluster Of Differentiation (Oberflächenantigen)
cDNA	Komplementäre DNA
Ci	Curie
cm ²	Quadratcentimeter
CMV	Zytomegalievirus
CO ₂	Kohlendioxid
ConA	Concanavalin A
cpm	Counts Per Minute (Zerfälle pro Minute)
CR	Cotton Rat (Baumwollratte)
DC	Dendritische Zelle
ddH ₂ O	doppelt-destilliertes Wasser
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMEM komplett	DMEM-Komplettmedium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

DNFB	Dinitrofluorobenzen
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphate
Dox	Doxyzyklin
dsDNA	Doppelsträngige DNA
DTH-Reaktion	Delayed Type Hypersensitivity reaction (Hypersensitivitätsreaktion vom Spättyp)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintriacetat
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EtOH	Ethanol
F	Fusionsprotein von Masernvirus
FACS	Fluorescence Activated Cell Scanner
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälberserum
FL	Fluoreszenz
FSC	Vorwärtsstreulicht, Zellgröße
FV	Friend virus
G _{0,1,2}	Zellzyklusphasen
GAPDH	Glyceraldehyd-Phosphat-Dehydrogenase
H	Hämagglutinin von Masernvirus
h	Stunde
hCD2	regulatorisches Element des humanen CD2-Promotors
³ HdT	Methyl- ³ H-Thymidin
i. n.	Intranasal
i. p.	Intraperitoneal
I.E.	Internationale Einheit
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IU	International Units
kb	Kilobasen
l	Liter
LK	Lymphknoten

L-Protein	Largeprotein
M	Mol
M1	Statistische Auswertung
MEM	Minimal Essential Medium
MEM komplett	MEM-Komplettmedium
mg	Milligramm
MGV	Rekombinantes Masernvirus
MHC	Major Hisocompatibility Complex (Haupthisto- kompatibilitäts-Komplex)
MIBE	Akute Einschlußkörperchen-Enzephalitis
min	Minute
mJ	Millijoule
ml	Milliliter
mM	Millimol
MOI	Multiplicity Of Infection
M-Protein	Matrixprotein
mRNA	Messenger RNA (Boten-RNA)
MV	Masernvirus
MVE	Masernvirus-induzierte Enzephalitis
N	Nukleokapsid
ng	Nanogramm
NK-Zellen	Natürliche Killerzellen
nm	Nanometer
NT-Test	Neutralisationstest
OD	Optische Dichte
p	Statistische Wahrscheinlichkeit
P _{bi}	Bidirektioneller Promotor
P _{minCMV}	Minimalpromotor von Zytomegalievirus
PBE	Plaque-bildende Einheit
PBL	Periphere Blutleukozyten
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)

PCR	Polymerase-Ketten-Reaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFU	Plaques Forming Units
pH-Wert	Negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
PolyA	Polyadenylierungssignal
P-Protein	Phosphoprotein
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Rounds Per Minute (Umdrehungen pro Minute)
RPMI	RPMI-Komplettmedium
RT	Raumtemperatur
(r)tetR	(reverser) Tetrazyklin-Repressor
(r)tTA	(reverser) Tetrazyklin-abhängiger Transkriptionsaktivator
s	Sekunde
S	Zellzyklusphase
SD	Standardabweichung
SFFV	Spleen Focus Forming Virus
SI	Stimulationsindex
SLAM	Signalling Lymphocyte Activation Molecule (CD150)
SSC	Seitwärtsstreulicht, Zellgranularität
ssDNA	Einzelsträngige DNA
SSPE	Subakute Sklerosierende Panenzephalitis
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose 50 %
Tet	Tetrazyklin
tet-FKS	Tetrazyklin-System getestetes fetales Kälberserum
TetOff-, TetOn-System	Varianten des Tetrazyklin-Expressionssystems
Tet-System	Tetrazyklin-Expressionssystem
TH1/2-Zelle	T-Helferzelle vom Typ 1/2
TRE	Transaktivator-abhängiges Element
U	Unit
UV	Ultraviolett

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
V/mA	Volt pro Milliampere
v/v	Volume Per Volume
VSV	Vesikuläres Stomatitisvirus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WTF	Wildtyp Fleckenstein
ZNS	Zentrales Nervensystem

Eigene Veröffentlichungen

Originalarbeiten

Streif, S., K. Pueschel, A. Tietz, J. Blanco, V. ter Meulen and S. Niewiesk. *Effector CD8⁺ T Cells are suppressed by measles virus infection during delayed type hypersensitivity reaction*. *Viral Immunology*, 2004; 17: 604-608.

Streif, S., A. Davidson, V. ter Meulen, S. Sidell and S. Niewiesk. *Toxic effect of measles virus glycoproteins counteracts regulated tet inducible expression in a transgenic mouse*. *Experimental and Toxicologic Pathology*, 2005 (in Vorbereitung).

Vorträge

S. Gfroerer. *Analysis of measles virus induced immune suppression using transgenic mice*. XI. measles virus meeting, Flein 2001.

S. Gfroerer. *Further results of the analysis of measles virus induced immune suppression using transgenic mice*. XII. measles virus meeting, Flein 2002.

Posterpräsentation

Gfroerer, S., M. Goetzelmann, V. ter Meulen and S. Niewiesk. *Suppression of delayed type hypersensitivity reaction and simultaneous immune activation after measles virus infection*. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin 2003.

Danksagung

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn **Prof. Dr. Volker ter Meulen** angefertigt. Ich danke ihm für die stete Unterstützung und sein großes Interesse an dieser Arbeit.

Außerdem möchte ich mich bei Herrn **Prof. Dr. Jürgen Kreft** für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur bedanken.

Ein besonderes Dankeschön geht an Herrn **PD Dr. Stefan Niewiesk**, der mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand. Durch seine exzellente Betreuung leistete er einen großen Beitrag zum Gelingen dieser Arbeit.

Meine Laborkollegen **Annette Tietz, Verena Muthig, Karen Püschel, Kay Klapproth, Tomas Racek** und **Gerald Weidinger** sorgten für ein sehr angenehmes Arbeitsklima. Sie hatten für mich und meine Fragen immer ein offenes Ohr.

Ein herzliches Dankeschön an alle **Korrekturleser!**

Meinem Mann **Jörg Streif** danke ich für seine Liebe!

Meine Mutter **Irene Gfrörer** war immer für mich da und hat mich stets unterstützt.

Euch allen ein Danke von Herzen!

Lebenslauf

Sabine Streif
(geb. Gfrörer)

Lutzstr. 9a
80687 München

Persönliche Daten

geboren am
Familienstand
Staatsangehörigkeit

27.07.1972 in Pirmasens
verheiratet
deutsch

Schulausbildung

09/1979 - 12/1981
01/1982 – 07/1983
09/1983 – 07/1993

Grundschule Pirmasens
Grundschule Marktoberdorf
Gymnasium Marktoberdorf

Studium

11/1993 – 07/2000

Studium der Biologie
Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

Diplomarbeit am Lehrstuhl für Mikrobiologie:
„Herstellung eines virulenzabgeschwächten *Salmonella typhimurium*-Stammes als Vektor für heterologe Antigen- beziehungsweise DNA-Präsentation“

Promotion

seit 08/2000

Promotion am Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg:
„Bedeutung der Glykoproteine für die Masernvirus-induzierte Immunsuppression“

Ausgeübter Beruf

seit 12/2004

Wissenschaftliche Mitarbeiterin am Institut für Entwicklungsgenetik des Forschungszentrums für Umwelt und Gesundheit GmbH (GSF), Neuherberg

München, 14. Februar 2005

Sabine Streif