

**Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie**

**der Universität Würzburg**

**Lehrstuhl für Virologie**

**Vorstand: Prof. Dr. med. A. Rethwilm**

**Die Rolle des Zytoskeletts**

**für die Replikation des Masernvirus**

**- insbesondere seiner Komponenten Aktin und Tubulin**

**Inaugural – Dissertation**

**zur Erlangung der Doktorwürde der**

**Medizinischen Fakultät**

**der**

**Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg**

**vorgelegt von**

**Tina Sibylla Bernardi**

**aus**

**Würzburg**

**Würzburg, Mai 2005**

**Referent:** Prof. Dr. rer. nat. J. Schneider-Schaulies

**Koreferent:** Prof. Dr. med. U. Vogel

**Dekan:** Prof. Dr. med. G. Ertl

**Tag der mündlichen Prüfung:** 29.03.2006

**Die Promovendin ist Ärztin**

*Für meine Eltern Marketta und Walter Bernardi,  
ohne die ich nicht bis hierher gekommen wäre ...*



# Inhalt

---

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Masernvirus</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Pathogenese und Klinik der Masernvirusinfektion	4
1.1.3	Diagnostik, Therapie und Prävention	9
1.1.4	Morphologie und Aufbau	11
1.1.5	Replikation und Genomaufbau	17
<b>1.2</b>	<b>Zelluläre Grundlagen</b>	<b>21</b>
1.2.1	Zelluläre Rezeptoren für das Masernvirus	21
1.2.2	Das Zytoskelett	24
1.2.3	Beziehungen zwischen MV und Wirtszelle	33
1.2.4	Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)	37
<b>1.3</b>	<b>Ziel der Arbeit</b>	<b>40</b>
<b>2</b>	<b>Material und Methoden</b>	<b>41</b>
<b>2.1</b>	<b>Material</b>	<b>41</b>
2.1.1	Zellen und Virus	41
2.1.2	Antikörper	42
2.1.3	Lösungen und Puffer	42
2.1.4	Chemikalien	46
2.1.5	Verbrauchsmaterial	47
2.1.6	Geräte	47
<b>2.2</b>	<b>Methoden</b>	<b>49</b>
2.2.1	Zellkultur	49
2.2.2	Isolierung primärer mononukleärer Zellen aus humanem Blut	49
2.2.3	Infektion	50
2.2.4	Chemische Behandlung und Beeinflussung der Zelle	50
2.2.5	Gewinnung des Probenmaterials	55
2.2.6	Plaquetitration	55
2.2.7	Immunperoxidase-Färbung	56
2.2.8	SDS-PAGE und Western Blot	57
<b>3</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>62</b>
<b>3.1</b>	<b>Untersuchung der Bedeutung des Polymerisationszustandes von Aktin für die Infektion mit MV</b>	<b>62</b>
3.1.1	Die Bedeutung von F-Aktin für die MV-Freisetzung aus PBMC	62
3.1.2	Erhöhung des G-Aktin-Pools in Vero-Zellen und die Folgen für die MV-Infektion	63

<b>3.2</b>	<b>Veränderung des mikrotubulären Polymerisationszustandes und ihr Einfluss auf die MV-Infektion</b>	<b>67</b>
3.2.1	Auswirkung einer Destabilisierung von Mikrotubuli in Vero-Zellen auf die Replikation von MV	67
3.2.2	Vergleich der Nocodazol-Wirkung in Vero-Zellen vor und nach MV-Infektion	69
3.2.3	Veränderungen des mikrotubulären Polymerisationszustandes und ihre Wirkung auf die MV-Ausbreitung	70
3.2.4	Mikrotubulus-Stabilisation durch Taxol und ihr Effekt auf die Virusfreisetzung aus PBMC	76
3.2.5	Versuch einer Beeinflussung der MV-Proteinmenge in PBMC durch Veränderung des Polymerisationszustandes der Mikrotubuli	77
<b>4</b>	<b>Diskussion</b>	<b>80</b>
<b>4.1</b>	<b>Die MV-Replikation hängt vom Vorhandensein und von der Menge des F-Aktins ab</b>	<b>80</b>
4.1.1	Eine Aktindepolymerisation hemmt die Virusfreisetzung, aber auch das Eindringen des Virus in die Zelle	80
4.1.2	Der Anteil an F-Aktin beeinflusst die Empfänglichkeit der Zelle für die MV-Infektionen	81
<b>4.2</b>	<b>Der Polymerisationszustand von Tubulin beeinflusst die MV-Infektion</b>	<b>82</b>
4.2.1	Eine intakte Mikrotubulusfunktion erscheint erforderlich für den Transport der viralen Proteine zur Zellmembran	82
4.2.2	Existiert ein mikrotubulärer Transport des viralen Genoms von der Eintrittspforte zum Replikationsort?	84
4.2.3	Die Fusion infizierter Zellen zu Synzytien nimmt unter Mikrotubulus-Stabilisation zu	85
4.2.4	Eine Destabilisierung der Mikrotubuli hemmt die MV-Proteinsynthese	86
4.2.5	Eine Stimulation der MV-Proteinsynthese durch polymerisiertes Tubulin bleibt unklar, aber nicht unwahrscheinlich	87
<b>4.3</b>	<b>Aktin und Tubulin sind erforderliche zelluläre Faktoren für eine effektive MV-Replikation</b>	<b>89</b>
<b>4.4</b>	<b>Vorstellung eines MV-Replikationszyklus in Abhängigkeit vom Zytoskelett</b>	<b>90</b>
<b>4.5</b>	<b>Die PHA-induzierte Aktivierung der PBMC wird durch Jasplakinolid und Taxol gehemmt</b>	<b>93</b>
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>95</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>97</b>
<b>7</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>109</b>

<b>8</b>	<b>Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen</b>	<b>113</b>
8.1	Abbildungen	113
8.2	Tabellen	114

**Danksagung**

**Lebenslauf**



# 1 Einleitung

---

## 1.1 Das Masernvirus

### 1.1.1 Epidemiologie

Masern sind eine Viruserkrankung, deren einziges Reservoir der Mensch ist. Die Übertragung erfolgt durch Tröpfcheninfektion bis in eine Entfernung von 5 m, in der Regel über den Respirationstrakt, aber auch den Oropharynx oder die Konjunktiven. Eine Übertragung durch Oberflächen und Stäube ist prinzipiell möglich, wegen der Umweltsensitivität des Virus jedoch keine wesentliche Verbreitungsquelle.

Der Kontagiositätsindex ist mit 98% sehr hoch. Die Reproduktionsrate liegt bei 17-20, d.h. in einer komplett empfänglichen Population gehen von einer Erkrankung 17-20 Folgeerkrankungen aus. Damit gehören die Masern zu den ansteckendsten Erkrankungen überhaupt. Fast 100% der Infizierten erkranken akut, asymptomatische Verläufe sind äußerst selten und kommen nur bei Vorhandensein von Antikörpern vor. Die Letalität liegt bei 1:3.000 und ist somit eher gering, steigt jedoch unter ungünstigen Bedingungen wie Immunsuppression, T-Zell-Defekten, hoher Infektionsdosis, Mangelernährung, und liegt in den Entwicklungsländern bei 10%.

Auch heute noch zählt die Masernvirusinfektion zu den gefährlichsten Infektionskrankheiten des Menschen. Weltweit erkrankten im Jahr 2000 schätzungsweise 30-40 Millionen Menschen an Masern, und ungefähr 770.000 starben an der Krankheit. 5 % aller Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren wurden durch das Masernvirus verursacht (WHO Homepage 2002). Folglich sind und bleiben Masern weiterhin eine führende Todesursache bei Kindern.

In den Industrieländern ist die Häufigkeit der Masern seit der 1963 eingeführten Impfung mit attenuierten MV stark zurück gegangen. So sank in Europa in den letzten zehn Jahren die Anzahl berichteter Masernfälle pro Jahr von über 300.000 im Jahr 1991 auf ca. 36.000 im Jahr 2000 (WHO Homepage 2002).

Dennoch kommt es auch in den sogenannten hoch entwickelten Ländern immer wieder zu Ausbrüchen. Statistisch gesehen treten alle 3-5 Jahre kleinere Masernepidemien auf, bevorzugt in den Monaten Januar bis April, und dauern im Schnitt 3-4 Monate (Doerr,

Medizinische Virologie, S.313). Der jüngste Ausbruch in Europa fand von Januar bis Mai 2003 mit 1.217 Erkrankungsfällen in Süditalien statt, wobei besonders die Gebiete und die Altersgruppen mit geringen Durchimpfungsraten betroffen waren: 89% (n = 1.082) aller Erkrankungen traten in den drei Regionen Abruzzen, Apulien und Kalabrien auf. Da die Impfraten für den Geburtsjahrgang 1996 in den Abruzzen nur 45% bzw. in Apulien 41% betragen, von den im Jahre 2001 Geborenen hingegen 71% bzw. 77% geimpft waren, erkrankten dort vor allem ältere Kinder. Entsprechend registrierte das italienische Überwachungssystem Sorveglianza Pediatri Sentinella (SPES), dass rund zwei Drittel der Erkrankten in der Altersgruppe der 10-14 Jährigen zu finden waren, während der Anteil der 1-4 Jährigen gerade einmal bei 12,3% bzw. 14,1% lag (Ciofi degli Atti and Salamaso 2003).

In Deutschland brach im Oktober 2001 eine größere Masernepidemie in Coburg aus, während der insgesamt 1.166 Masernerkrankungen registriert wurden. Ursache dieses Ausbruchs war ebenfalls eine niedrige Impftrate, die im Kreis Coburg bei nur 75 % lag. Dahingegen konnte eine Impftrate von über 90 % in den Nachbarkreisen die weitere Ausbreitung verhindern; hier kam es nur zu sporadischen Fällen. Die Epidemie selbst konnte nur durch eine Riegelungsimpfung gestoppt werden. Dennoch mussten 43 Personen mit Komplikationen stationär behandelt werden. Mindestens 94 % der Erkrankten waren nicht geimpft, und so zeigt sich an den beiden letztgenannten Beispielen einmal mehr, wie überaus wichtig eine hohe Durchimpfungsrate ist (RKI Epidemiologisches Bulletin 2002).

Nur eine konsequente und flächendeckende Impfung der Bevölkerung ermöglicht die Unterbrechung der Virusübertragung und eine weltweite Ausrottung der Masern, die erklärtes Ziel der WHO bis zum Jahr 2007 ist. In einigen Ländern ist dies bereits gelungen, so ist beispielsweise in Finnland, wo es noch in den 70er Jahren 15.000 Masernerkrankungen pro Jahr gab, seit 1996 keine autochthone Masernerkrankung mehr aufgetreten (Rose 2003). Die dort gesammelten Erfahrungen belegen, dass eine Eliminierung der Masern in einem europäischen Land bereits innerhalb weniger Jahre möglich ist, wenn nur die Impfstrategie und die Surveillance konsequent gehandhabt wird.

Problematisch hingegen ist die Situation in den Entwicklungsländern, wo 1998 noch schätzungsweise 888.000 Menschen an Masern gestorben sind. Die problematische Ernährungslage, die mangelnde Hygiene und die schlechte medizinische Versorgung weiter Teile der Bevölkerung in der Dritten Welt sorgen dafür, dass Masern dort die häufigste Todesursache bei Kindern ist. Auch sind in Afrika nur 49% der Kinder im ersten Lebensjahr gegen Masern geimpft. Bis 2005 soll der Anteil laut der Global Alliance for Vaccines and Immunization (GAVI) auf 80% gesteigert werden (Nigel 2000). Die flächendeckende Impfung der Bevölkerung erweist sich in den Entwicklungsländern jedoch aus vielerlei Hinsicht als schwierig. Neben allgemeiner logistischer Probleme wirkt sich auch die Thermolabilität des Impfstoffes negativ auf dessen Transport aus. Hinderlich ist außerdem die Anzahl von HIV-Erkrankungen, die gerade in Ländern mit starker Masernvirusdurchseuchung im Steigen begriffen ist. Zum einen verläuft unter der HIV-induzierten Immunsuppression die Erkrankung weitaus fulminanter, zum anderen ist die Impfung wenig wirksam: Bei HIV-infizierten Kindern konnte auch nach zweimaliger Immunisierung kein ausreichender Schutz vor Masernvirusinfektion vermittelt werden. Die Impfprobleme in den Entwicklungsländern veranlassten die WHO, verbesserte Programme zur Prävention, Erforschung der Pathogenität und Entwicklung neuer Vakzine zu verabschieden.

Leider zeigt die Impfstatistik, dass auch Europa keineswegs flächendeckend mit der geforderten Impfrate von 95% aufwarten kann. So liegt der Anteil geimpfter Schulkinder in Deutschland mit 70-85% durchaus noch unter dem Sollwert, und die empfohlene zweite Impfung haben sogar weniger als 15% erhalten (WHO Homepage 2002). Grund hierfür ist unter anderem eine skeptische oder auch ablehnende Haltung gegenüber Schutzimpfungen in Teilen naturheilkundlich ausgerichteter Bevölkerungsgruppen. Ein gutes Beispiel für die Folgen einer solchen Auffassung ist der Masernausbruch vom Januar 2003 im Landkreis Verden, der seinen Ursprung in einem anthroposophischen Kindergarten bzw. Schulkomplex hatte und im wesentlichen darauf beschränkt blieb (RKI Epidemiologisches Bulletin 2003).

Die Ablehnung von Impfungen beruht zum Teil auf der weit verbreiteten Furcht vor möglichen Komplikationen und Schäden. Die Statistiken zeigen jedoch, dass die Häufigkeit schwerwiegender Komplikationen, die durch die Masernimpfung verursacht werden, deutlich hinter der Häufigkeit der Schäden zurück bleibt, die bei einer

Masernerkrankung drohen: während bei der Mumps-Masern-Röteln Schutzimpfung bei weniger als 1 von 1.000.000 Geimpften eine Enzephalitis auftritt, entwickelt 1 von 1.000 an Masern Erkrankter eine Enzephalitis, die zu bleibenden Hirnschädigungen führen kann. Insgesamt muss bei 30% der Masernfälle mit Komplikationen und Folgeschäden gerechnet werden (CDC 2002).

Ein weiteres Problem bei der Impfung ist, dass die maternalen Antikörper den Säugling im Alter zwischen 6 und 12 Monaten nicht mehr vor einer Maserninfektion schützen, eine Immunisierung durch den bestehenden Impfstoff jedoch verhindern (Garenne *et al.* 1991; Aaby *et al.* 1993). Während dieser Zeit gibt es also keine verlässliche Methode, das Kind gegen eine Masernvirusinfektion zu schützen.

Bis zur vollständigen Ausrottung der Masern ist es demnach noch ein langer Weg, und die Krankheit darf keineswegs unterschätzt werden. Die jüngsten Ausbrüche zeigen, dass das Virus noch immer ernst zu nehmen ist, und dass nicht nur in den Entwicklungsländern eine konsequente Aufklärung und Impfung der Bevölkerung vonnöten ist.

Es muss daher auch weiterhin Ziel bleiben, die Infektionswege der Maserviruswildstämme zu erforschen und neue effizientere Vakzine zu entwickeln.

### ***1.1.2 Pathogenese und Klinik der Masernvirusinfektion***

Die vom Masernvirus verursachte Krankheit sind die Masern, zu deren Hauptsymptomen katarrhalische Erscheinungen des oberen Respirationstraktes sowie ein typisches Exanthem zählen.

Der Verlauf der Masernerkrankung lässt sich klinisch in drei Stadien unterteilen: Das Prodromalstadium, das Exanthem- und das Rekonvaleszenzstadium.

Die Inkubationszeit beträgt in der Regel 11 (8-12) Tage bis zum Auftreten der Prodromalsymptome, dauert ca. 14 Tage bis zum Auftreten des Exanthems an und verläuft symptomlos, lediglich eine Leukopenie kann auftreten. Die Infektiosität beginnt bereits eine Woche vor Beginn des Exanthems und ist bis 3-4 Tage danach noch gegeben.

## PATHOGENESE

Eintrittspforte für das MV bildet das Epithel des Respirationstraktes, des Nasopharynx und der Konjunktiven. In den infizierten Mukosaepithelzellen erfolgt daraufhin die Replikation des Virus, und das anschließend freigesetzte Virus befällt die Makrophagen und dendritischen Zellen der Umgebung. In den infizierten Makrophagen wird das Adhäsionsmolekül LFA-1 verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert, was den Zelleintritt in Gewebe erleichtert und die Verbreitung des Virus fördert (Attibele *et al.*, 1993). Die infizierten Makrophagen und dendritischen Zellen wiederum transportieren das MV in die lokalen Lymphknoten, wo eine weitere Replikation statt findet, und die nach 2-4 Tagen eine erste Virämie zur Folge hat. Mit dem Blut gelangt das Virus in das retikuloendotheliale System, insbesondere in weitere Lymphknoten und in die Milz, wo es sich in Lymphozyten, Makrophagen und Monozyten weiter repliziert. Makroskopisch erkennbar ist diese Phase an einer Milz- und Lymphknotenschwellung, mikroskopisch sieht man die typischen retikuloendothelialen Riesenzellen mit eosinophilen zytoplasmatischen Einschlusskörperchen, auch Warthin-Finkeldey-Zellen genannt. Sie entstehen durch F-Protein-vermittelte Fusion infizierter Endothelzellen mit benachbarten nicht infizierten Zellen. Während der MV-Infektion finden sich die viralen Membranproteine H und F auf der gesamten Oberfläche von polarisierten Epithelzellen. Die Freisetzung der Viruspartikel allerdings findet ausschließlich an der apikalen Seite statt. Die basolateral befindlichen Virusproteine bewirken nicht das Budding, sondern die Zell-Zell-Fusion. Dadurch wird eine Ausbreitung der Virusinfektion in andere Gewebe möglich.

Im Rahmen dieser zweiten Stufe der Virusreplikation folgt am vierten Tag eine zweite Virämie, die vor allem durch aktivierte Lymphozyten zustande kommt.

Außer den Riesenzellen des retikuloendothelialen Systems werden auch epitheliale Riesenzellen in allen Schleimhäuten gebildet und können in den jeweiligen Sekreten nachgewiesen werden. Der Untergang der Riesenzellen und die Nekrotisierung des infizierten Gewebes korrelieren klinisch mit den sogenannten Koplik-Flecken, die etwa am neunten Tag an allen Schleimhäuten zu finden sind.

Im Verlauf der zweiten Virämie entsteht das Exanthem (Kempe *et al.* 1965; Moench *et al.* 1988; Esolen *et al.* 1993). Verursacht wird es durch virusbedingte oder toxisch-allergische Permeabilitätssteigerung von Gefäß- und Zellwänden. Diese führt zu einem hämorrhagischen Einschlag des Exanthems und kann außerdem Endothelschäden im Bereich der Lungenkapillaren verursachen (Pschyrembel 1997). Zu diesem Zeitpunkt kann das Virus auch in den peripheren Leukozyten des Blutes nachgewiesen werden.

Das Auftreten des Exanthems markiert den Beginn der humoralen und der zellulären Immunantwort: Die B-Lymphozyten produzieren masernspezifische Antikörper, und zytotoxische T-Lymphozyten zerstören die infizierten Zellen. Bereits einen Tag nach Beginn des Ausschlags kann kein Virus mehr aus dem Blut oder Respirationstrakt angezüchtet werden. Der gleichzeitige Untergang der Riesenzellen verursacht eine Leuko- bzw. Lymphopenie.

Bei bereits vor der Infektion immunsupprimierten Patienten beobachtet man ein Fehlen des Exanthems. Es kommt zur ungehinderten Proliferation des Bronchialepithels mit Riesenzellbildung und schließlich zu der sogenannten Hecht'schen Riesenzellpneumonie, die in etwa 30% der Fälle tödlich verläuft. Auch im retikuloendothelialen System breitet sich die Infektion weiter aus und streut in diverse Organe. Zudem findet man bei dieser Patientengruppe häufig eine progressive Form der Masernenzephalitis.

## KLINISCHE SYMPTOMATIK

Zu Beginn des Prodromalstadiums stehen unspezifische Allgemeinsymptome wie leichtes Fieber, Appetitlosigkeit, Rhinitis, Konjunktivitis, Lichtscheu und Heiserkeit im Vordergrund. Am neunten Tag ab Exposition zeigen sich die typischen Koplik-Flecken sowie ab Tag 11 ein Exanthem der Mundschleimhaut. Meist sinkt das Fieber am Ende des Prodromalstadiums ab und der Patient verspürt eine deutliche subjektive Besserung der Beschwerden.

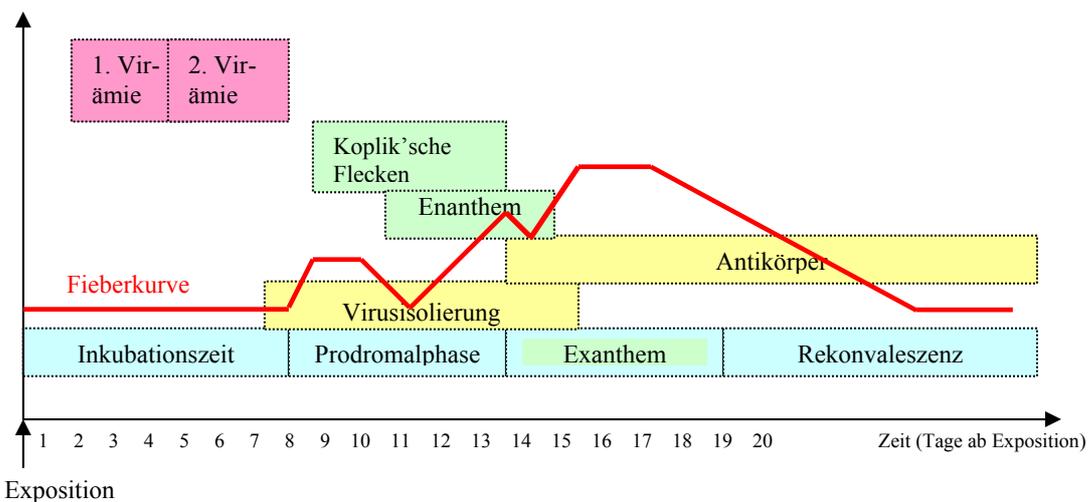
Das anschließende Exanthemstadium dauert etwa drei Tage und ist mit einem Fieberanstieg auf 39-40 °C verbunden. Typischerweise beginnt das intensiv rote makulopapulöse Exanthem im Kopfbereich, oft hinter den Ohren, im Nacken oder auf

der Stirn. Von dort breitet es sich kontinuierlich auf den Stamm und die unteren Extremitäten aus. Gleichzeitig beginnt im Kopfbereich die Besserung des Ausschlags, die sich in Reihenfolge der Ausbreitung fortsetzt.

Im Rekonvaleszenzstadium sind die Symptome der Masernerkrankung bereits abgeklungen, jedoch bleibt eine erhöhte Anfälligkeit gegenüber anderen Erkrankungen bestehen und begünstigt Superinfektionen (Doerr, Medizinische Virologie 2002, S. 314). Diese Immunsuppression kann bis zu 2 Monate andauern. Dabei bleibt die Immunantwort gegenüber Masernvirus unbeeinflusst, während die Immunantwort gegenüber anderen Antigenen supprimiert ist.

Die Maserninfektion hinterlässt eine lebenslange Immunität.

Den klinischen Krankheitsverlauf zeigt Abbildung 1.



**Abbildung 1: Zeitlicher Krankheitsverlauf bei Masern.**  
(nach Doerr, Medizinische Virologie 2002)

Der Pfeil markiert den Expositionszeitpunkt, auf der x-Achse werden die Tage ab Exposition gezählt. Rot dargestellt ist der Verlauf der Fieberkurve. Die blauen Balken zeigen die verschiedenen Stadien der Infektion, gelb erscheint das in der Diagnostik wichtige Auftreten von isolierbaren Viren und Antikörpern. Grün markiert sind die Hautsymptome der Masernerkrankung, pink die beiden virämischen Phasen.

## KOMPLIKATIONEN

Mit einer Häufigkeit von 5-10% der Fälle zählt die Otitis media zu den häufigsten Komplikationen. Sie ist in der Regel Folge einer bakteriellen Superinfektion und muss daher antibiotisch behandelt werden. Daneben kann die Maserninfektion später zu einer Otosklerose führen.

Die zweithäufigste Gruppe der Komplikationen stellen mit 1-6% die verschiedenen Pneumonien, zu der die Hecht'sche Riesenzellpneumonie, die atypische Masernpneumonie sowie die Pneumonien durch bakterielle Superinfektion zählen.

Auch bei den Masernenzephalitiden unterscheidet man mehrere Gruppen: die akute postinfektiöse Enzephalitis (APME), die Masern-Einschlusskörperchen-Enzephalitis (MIBE) und die subakut sklerosierende Enzephalitis (SSPE).

Die akute postinfektiöse Enzephalitis entwickelt sich direkt im Anschluss an die Masern und führt über einen autoimmunen Mechanismus zur Reaktion gegen das basische Myelinprotein (MBP), möglicherweise verursacht durch molekulares Mimikry der Myelinproteine durch MV oder eine veränderte Präsentation der Selbst-Antigene nach Oligodendrozyten-Infektion (Jahnke *et al.* 1985). Dadurch kommt es zu einer Entmarkung der Myelinscheiden im ZNS mit typischer Symptomatik. Die Häufigkeit liegt bei 1:1.000, die Letalität beträgt 15%. 25% der Betroffenen tragen bleibende Schäden davon.

Die akut-progressive infektiöse MIBE entsteht durch eine massive Virusreplikation im Gehirn und tritt 3 bis 6 Monate nach der akuten Masernerkrankung bei immunsupprimierten Patienten auf. So bestimmt auch der Schweregrad des Immundefizits die Prognose.

Mit einer Inzidenz von 1:10.000 (CDC 2002) ist die SSPE die seltenste der Masernenzephalitiden, mit einer Letalität von fast 100% jedoch auch die schwerste. Verursacht wird sie durch Virusmutanten, die bei einer disseminierten Infektion der Immunantwort entkommen und sich innerhalb des Zentralnervensystems von Zelle zu Zelle ausbreiten. Die SSPE zählt zur Gruppe der Slow-Virus-Infektionen, die durch eine extrem lange Inkubationszeit von Monaten bis Jahren, einen zum Tode führenden

langsam progredienten Krankheitsverlauf und durch eine Limitierung auf ein Organ bzw. ein Organsystem gekennzeichnet sind.

Nach einer Latenzzeit von 6-15 Jahren beginnt die SSPE mit mentalen Defiziten, dann folgen neurologische Ausfallserscheinungen wie Myoklonien, Ataxien, Spastiken und epileptische Anfälle. Zuletzt beobachtet man eine zunehmende Dezerebrationsstarre. Eine Masernimpfung kann das Auftreten der SSPE völlig verhindern und die akute postinfektiöse MV-Enzephalitis auf eine Frequenz von  $10^{-6}$  reduzieren (Duclos *et al.* 1998).

Obwohl apparente neurologische Erkrankungen selten sind, scheint das MV oft eine transiente Irritation des ZNS auszulösen, da bei ca. 50% der akuten Infektionen Veränderungen im EEG der Patienten zu beobachten sind, ohne dass gleichzeitig Virus im ZNS nachweisbar wäre (Gibbs *et al.* 1959; Hanninen *et al.* 1980).

### ***1.1.3 Diagnostik, Therapie und Prävention***

Obwohl die Masern anhand ihres typischen klinischen Bildes relativ gut diagnostizierbar sind, ist eine labordiagnostische Sicherung in jedem Fall zu empfehlen. Da es in den letzten Jahren vermehrt zu atypischen Verläufen kommt, ergeben sich des öfteren diagnostische Schwierigkeiten. Untersuchungen zeigten, dass bei sporadischen Verdachtsfällen die Diagnose Masern nur in etwa 28% bestätigt wurde (RKI 2002).

MV kann in verschiedenen Körpermaterialien nachgewiesen werden. Aus infizierten Epithelzellen im Mund- und Rachenbereich ist eine Isolation über Rachenabstriche möglich. Ebenfalls geeignet sind Abstriche aus Konjunktiven sowie Sputum und, bei einer Enzephalitis, aus Liquor. Die Ausscheidung von Masernviren mit dem Urin erlaubt eine Virusisolation aus den enthaltenen Makrophagen. Zudem kann das Masernvirus aus infizierten peripheren mononukleären Zellen des Blutes isoliert werden (Enders 1962; Lightwood and Nolan 1970).

Serologische Diagnostik weist masernspezifische Antikörper der Klassen IgM und IgG nach und erfolgt mittels ELISA, Hämagglutinationshemmtest, Neutralisationstest, Komplementbindungstest oder Immunoblot.

Bei Verdacht auf SSPE kann das EEG zur Diagnosesicherung beitragen, da nicht selten ein charakteristisches Muster erkennbar ist. Im Liquor ist kein Virus nachweisbar, jedoch geben oligoklonale masernspezifische Antikörper-Banden in der Isoelektrischen Fokussierung einen Hinweis auf eine lokale lymphozytäre Immunreaktion. IgA und IgM im Liquor sind im Allgemeinen ebenfalls negativ, IgG ist jedoch signifikant erhöht. Histologisch nachweisbar und pathognomonisch sind eosinophile Einschlusskörperchen sowie Virusnukleokapside und virale RNA.

Eine kausale Therapie ist nicht bekannt, und auch die symptomatische Therapie ist nicht standardisiert. Bei lebensbedrohlichen Verläufen kann eine intravenöse Ribaviringabe erwogen werden. So berichtet eine japanische Forschergruppe von einer erfolgreichen Kombinationstherapie mit Interferon Alpha und Ribavirin bei SSPE. Trotz eines nachweisbaren und schnellen Abfalls der Viruslast schritten die neurologischen Defizite allerdings weiter fort (Hara *et al.* 2003).

Seit 1970 existiert ein Lebendimpfstoff aus über Hühnerembryozellen attenuierten Masernvirusstämmen, der meist in Kombination mit Mumps- und Rötelnimpfstoff als sogenannte MMR-Vakzine angeboten wird.

Die Erstimpfung wird im Alter von 11-14 Monaten empfohlen, nach dem Verschwinden der maternalen Antikörper, welche die Ausbildung eines ausreichenden Impfschutzes behindern. Nach 4-6 Wochen ist eine Immunantwort nachweisbar. Da die mittleren Antikörpertiter niedriger liegen als nach natürlicher Infektion, ist eine Zweitimpfung als Booster sinnvoll. Diese kann bereits 4 Wochen nach der ersten erfolgen und wird für den 15. bis 25. Lebensmonat angeraten.

Die Serokonversionsrate beträgt nach der ersten Immunisierung 90%, nach der zweiten 98%. Im Durchschnitt hält der Impfschutz 20 Jahre an.

Ebenfalls möglich ist eine aktive Expositionsimpfung innerhalb von 72 Stunden nach Kontakt, die sogenannte Riegelungsimpfung.

Impfkomplikationen sind selten, ungefähr 5% der Geimpften erkranken 1 Woche nach der Vakzinierung an den sogenannten Impfmasern mit Fieber, Exanthem und Konjunktivitis. Seltener sind eine Thrombozytopenie, die innerhalb von 2 Monaten nach Impfung auftreten kann. In Europa hat man einen Fall unter 30.000 bis 40.000 Geimpften beobachtet (CDC 2002). Das Risiko, an einer Enzephalitis zu erkranken, ist

mit einer Wahrscheinlichkeit von 1:1.000.000 nicht höher als das Risiko der Kontrollgruppe.

Bei Kindern mit Immundefizienz kann unter Umständen eine Passivimmunisierung vorgenommen werden.

#### ***1.1.4 Morphologie und Aufbau***

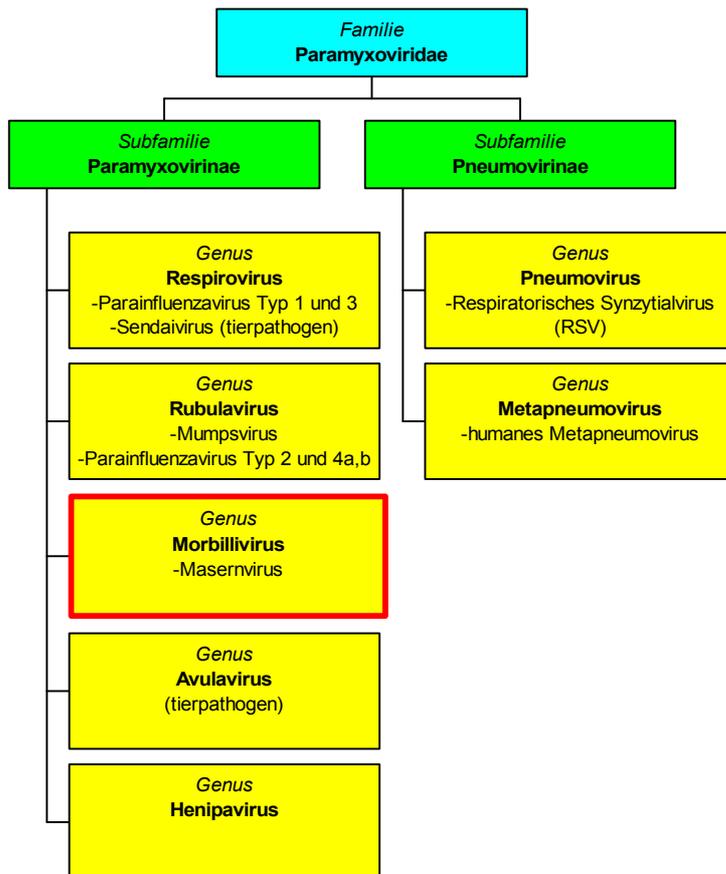
##### TAXONOMIE

Das MV ist ein einzelsträngiges RNA-Virus, dessen Genom in Negativstrangorientierung vorliegt. Es gehört der Familie der Paramyxoviren an und wird dem Genus der Morbilliviren zugerechnet. Die anderen Morbilliviren sind tierpathogen, zu ihnen zählen neben anderen auch das Hundestaupevirus (CDV) sowie das Rinderpestvirus.

Die Morbilliviren werden von den anderen humanpathogenen Genera der Subfamilie der Paramyxovirinae abgegrenzt. Zu dieser gehören das Genus der Respiroviren mit den humanen Parainfluenzaviren Typ 1 und 3 sowie dem murinen Sendai Virus, und das Genus der Rubulaviren, die das humane Mumpsvirus sowie die Parainfluenzaviren Typ 2 und 4 umfasst.

Eine zweite Subfamilie bilden die Pneumovirinae, zu der die Genera des Metapneumovirus und des Pneumovirus, unter welches das Respiratorische Synzytialvirus (RSV) fällt, zählen.

Eine Übersicht über die Familie der Paramyxoviren und ihre wichtigsten humanpathogenen Vertreter gibt Abbildung 2.



**Abbildung 2: Familie der Paramyxoviridae und ihre wichtigsten Vertreter.**

Die Familie der Paramyxoviridae ist blau hinterlegt, die beiden Subfamilien grün. In den gelben Kästen sind die Genera eingetragen, das Genus der Morbilliviren, zu denen das Masernvirus gehört, ist rot umrahmt.

## STRUKTUR

Trotz Mutationen im Hämagglutinin-Gen und daraus resultierenden Veränderungen im H-Protein gibt es nur einen Antigentypen, was die Impfung und Eradikation erleichtert.

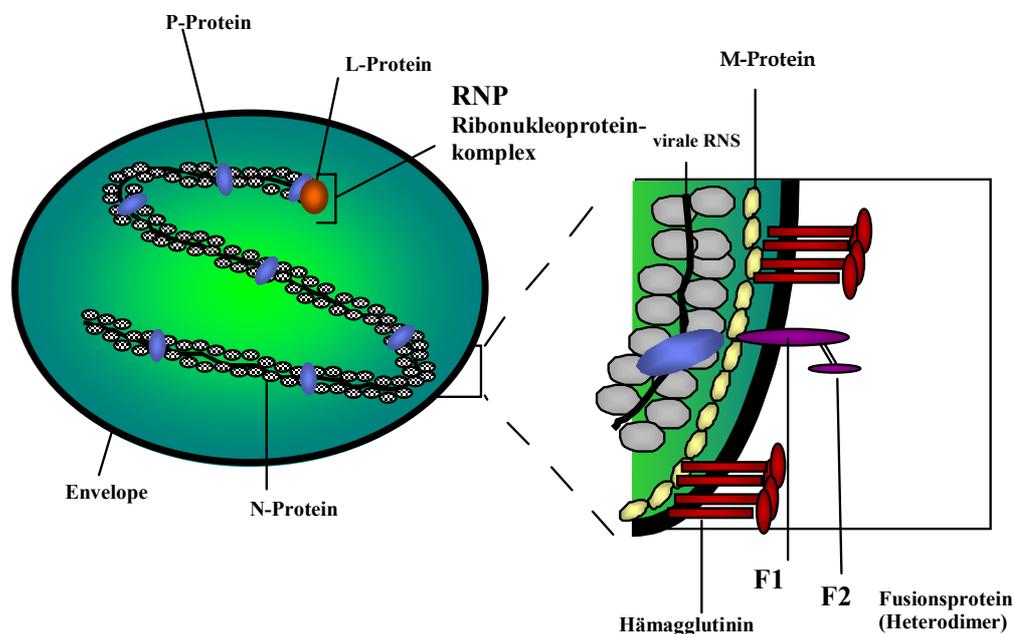
Wie alle Paramyxoviren ist das MV thermolabil und lichtempfindlich. Der hohe Lipidgehalt macht es außerdem empfindlich gegenüber Detergenzien, Denaturierung und Lösungsmitteln.

Das infektiöse Viruspartikel besitzt eine pleomorphe Form mit einem Durchmesser von 100-300 nm. Das Nukleokapsid mit einem Durchmesser von 12-16 nm und einer

Gesamtlänge von 1,2 µm weist eine helikale Symmetrie auf. Umgeben wird es von einer Lipidhülle, die bei der Knospung (Budding) aus der Wirtszellmembran entsteht und somit in seiner Grundstruktur einer Plasmamembran entspricht. In die Membranoberfläche sind die transmembranären viralen Glykoproteine Hämagglutinin (H) und Fusionsprotein (F) eingelagert. Zur Innenseite wird die Hülle durch das Matrixprotein (M) abgegrenzt. Im Innern des Viruspartikels befindet sich der helikale Ribonukleoprotein-Komplex (RNP). Der RNP-Komplex wird von der viralen RNA, dem Nukleokapsidprotein (N), dem Phosphoprotein (P; kleine Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase) sowie dem sogenannten Large-Protein (L; große Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase) gebildet.

Insgesamt existieren acht MV-Proteine, davon sind sechs Strukturproteine (F, H, M, N, P, L), die Aufbau und Pathogenität des Virus ausmachen, und zwei Nichtstrukturproteine (C,V), die dessen Transkription und Replikation regulieren.

In Abbildung 3 ist die Architektur des Masernvirus schematisch dargestellt.



**Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Masernvirus.**

Die Beschriftung erfolgt in der Zeichnung. Rechts ist ein Ausschnitt aus der Hüllmembran des Virus gezeigt.

Das **Matrixprotein** (M, 38 kDa) besitzt basische und hydrophobe Eigenschaften und kann daher sowohl mit dem Nukleokapsid als auch mit der Plasmamembran assoziieren. Auf diese Weise stellt es die Verbindung zwischen dem RNP-Komplex und der viralen Hülle (Envelope) her und bildet die Proteinschicht an der Membraninnenseite. Vermutlich stabilisiert oder präpariert es die Zytoplasmamembran, so dass die virale Knospung, auch Budding genannt, stattfinden kann. Bindet es an den RNP-Komplex, wird die Transkription inhibiert (Suryanarayana *et al.* 1994). Von Cathomen *et al.* wurde 1998 eine fusionsregulierende Wirkung beschrieben. Außerdem ist das M-Protein am Assembly der Viruspartikel beteiligt. Bei persistierenden MV-Infektionen, während derer kein Budding stattfindet, wie beispielsweise bei SSPE und MIBE wurden Mutationen insbesondere im M-Gen beobachtet.

Dieses Protein spielt also eine Hauptrolle beim Budding, auch wenn der genaue Mechanismus noch unklar ist.

Das **Hämagglutinin** (H, 78 kDa) ist in der Membran verankert und interagiert mit dem zellulären Rezeptor. Das H-Protein bewirkt *in vitro* eine Hämagglutination von Affenerythrozyten, die im Gegensatz zu humanen Erythrozyten CD46 auf der Zelloberfläche exprimieren.

Das Hämagglutinin gehört zur Gruppe der Membranproteine vom Typ II, das heißt die hydrophobe Sequenz sitzt am aminoterminalen Ende und ist somit nach außen gerichtet. Diese Sequenz dient auch als Signalsequenz zum Transport des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum (ER) der Wirtszelle, wo es durch die ER-Membran geschleust und dann in der Membran verankert wird. Im ER wird das carboxyterminale Ende glykosyliert. Der Transport zum Golgi-Apparat erfolgt in Form eines Dimers, dessen zwei Ketten über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind. Im Golgi-Apparat werden die Zuckgruppen weiter modifiziert. An der Zelloberfläche bildet das Hämagglutinin ein tetrameres Molekül.

Die Bindung des H-Proteins an den zellulären Rezeptor ist Voraussetzung für die Fusion des F-Proteins. Vermutlich bewirkt H als Fusionshelfer eine optimale F-Positionierung im Rezeptor-H-F-Komplex (Buchholz *et al.* 1996), da nur die Doppelexpression von F und H zur Synzytienbildung führt. Somit hat die Interaktion von H-Protein und zellulärem Rezeptor entscheidende Bedeutung für die MV-Infektion.

Das **Fusionsprotein** (F, 60 kDa) ist ein Typ I-glykosyliertes Transmembranprotein, dessen N-Terminus hydrophil und in der Membran nach außen gerichtet ist. Die Synthese von F erfolgt über das inaktive Vorläuferprotein F<sub>0</sub> (60 kDa), das im ER der Wirtszelle glykosyliert wird. Eine Endoprotease, meist Furin, schneidet das F<sub>0</sub>-Protein in die beiden Untereinheiten F<sub>1</sub> (40kDa) und F<sub>2</sub> (20 kDa). Diese bleiben über eine singuläre Disulfidbrücke verbunden.

Die F<sub>1</sub>-Untereinheit entstammt dem carboxyterminalen Ende des F<sub>0</sub>-Proteins und ist in der Virushülle verankert. Der C-Terminus ist vermutlich für die Interaktion mit dem M-Protein verantwortlich und damit für die Virusarchitektur. Das aminoterminalen Ende des F<sub>1</sub> enthält das fusionsaktive Peptid, eine hydrophobe Region, die bei Paramyxoviren hoch konserviert ist. Die extrazelluläre Region von F<sub>1</sub> besitzt in der Nähe der Transmembrandomäne ein LeuzinZippermotiv sowie eine cysteinreiche Region. Das F-Protein wird an der Oberfläche als Homotrimer oder als Homotetramer exprimiert (Malvoisin 1993).

Die F<sub>2</sub>-Untereinheit enthält drei N-Glykosylierungsstellen, die jeweils für die Reifung, das Schneiden und die Funktion des F-Proteins notwendig sind (Hu *et al.* 1995).

Das F-Protein vermittelt die Fusion von Virus- und Zellmembran. Die Expression des F-Proteins allein reicht allerdings nicht aus, um eine Membranfusion zu bewirken. Hierfür ist das gleichzeitige Vorhandensein des H-Proteins notwendig (Wild *et al.* 1991). Überschüssiges F-Protein kann auch die Fusion einer infizierten Zelle mit Nachbarzellmembranen bewirken und auf diese Weise Synzytien bilden.

Daneben weisen viele Masernvirusstämme, die aus Hirngewebe von SSPE-Patienten isoliert wurden, Mutationen im C-Terminus auf (Cattaneo *et al.* 1998; Schmid *et al.* 1992).

Offenbar trägt also auch das F-Protein entscheidend zum Assembly und Budding bei.

Das **Nukleokapsidprotein** (N) erscheint bei der PAGE als 60kDa-Bande, wird in der Zelle jedoch meist durch Proteasen in 41- und 45kDa-Polypeptide gespalten.

Das N-Protein wird an freien Ribosomen translatiert und im Zytoplasma gefaltet. Seine Funktion wird wahrscheinlich durch Phosphorylierung geregelt.

Das Nukleokapsidprotein ist gemeinsam mit P und L Hauptbestandteil des Nukleokapsids, das wiederum mit der viralen RNA zusammen den Ribonukleoproteinkomplex des Virus bildet. Das N-Protein selbst kann sowohl mit viraler m-RNA ((+)-RNA) als auch mit genomischer Nukleinsäure ((-)-RNA) assoziieren. Damit spielt es eine entscheidende Rolle bei der Replikation und Transkription des viralen Genoms.

Für die Bindung an P ist der N-Terminus des Proteins verantwortlich, und daher ist die Aminosäuresequenz dieser Region relativ konstant. Dagegen ist die Region am C-Terminus nicht unbedingt notwendig für die Komplexierung und besitzt eine variable Aminosäuresequenz. Analysen dieser Region ermöglichen eine Identifikation des Genotyps und somit eine Untersuchung der molekularen Epidemiologie der Masern.

Weiterhin trägt die Interaktion von N- und M-Protein wesentlich zum Assembly des MV bei.

Das **Phosphoprotein** (P, 72 kDa) assoziiert als Teil des RNA-abhängigen Polymerasekomplexes mit N und der m-RNA. Deshalb liegt es gehäuft an den transkriptionsaktiven Stellen der genomischen RNA vor. Am N-Terminus ist es phosphoryliert, am C-Terminus befindet sich die Sequenz zur Interaktion mit N und L. Die Bindung von P an das Large-Protein bewirkt dessen Aktivierung.

Das **Large-Protein** (L) ist mit 200 kDa das größte der MV-Proteine und wurde dem entsprechend auch Large-Protein (large = englisch für groß) genannt. Es ist der katalytische Teil des Polymerasekomplexes und neben der Initiation, Elongation und Termination der RNA-Synthese ist L für das "Capping" und die Polyadenylierung der viralen Transkripte verantwortlich.

Das **V-Protein** (V, 40 kDa) enthält eine zinkbindende Domäne. Ebenso wie das **C-Protein** (C, 21 kDa) ist es für die negative Regulation der RNA-Replikation verantwortlich.

Die nachfolgende Tabelle gibt einen Überblick über die wichtigsten MV-Proteine, ihre Lokalisation und Funktion:

**Tabelle 1: Zusammenfassung der MV-Proteine und ihrer Charakteristika.**

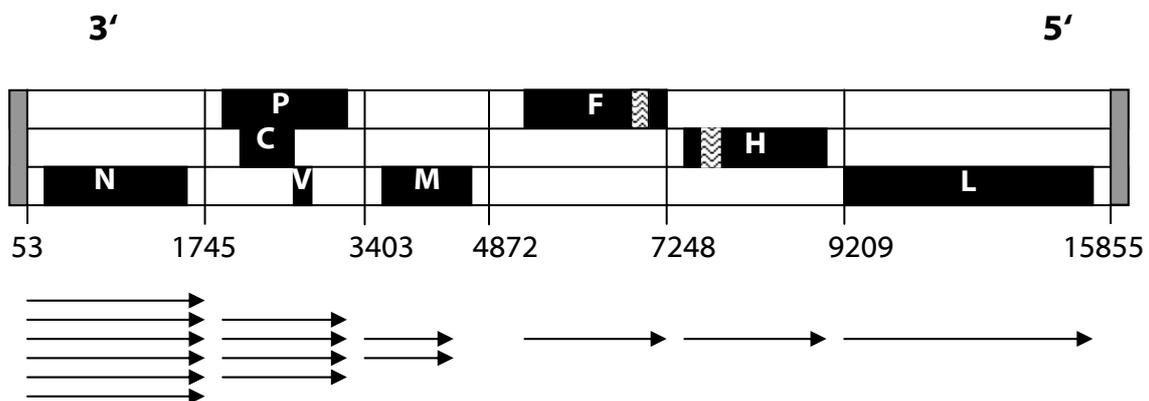
Protein	Größe (kDa)	Lokalisation		Funktion	
		Virion	Infizierte Zelle		
<b>Nukleoprotein (N)</b>	60	Nukleokapsid	Zytoplasma	Nukleokapsidbildung Replikationskomplex	<b>Strukturproteine</b>
<b>Phosphoprotein (P)</b>	72	Nukleokapsid	Zytoplasma	Nukleokapsidbildung Replikationskomplex Assoziation mit N und L	
<b>Matrix oder Membran (M)</b>	38	Innenseite der Lipidhülle	Innenseite der Plasmamembran, Zytoplasma (persistierende Infektionen)	Budding Verbindung zwischen Hülle und Nukleokapsid	
<b>Fusion (F)</b>	60	Transmembranäres Oberflächenprotein	ER, Golgi, Plasmamembran	Membranfusion Penetration	
<b>Hämagglutinin (H)</b>	78	Transmembranäres Oberflächenprotein	ER, Golgi, Plasmamembran	Adsorption Hämagglutination	
<b>Large-Protein (L)</b>	200	Nukleokapsid	Zytoplasma	RNA-abhängige RNA-Polymerase Transkriptions- und Replikationskomplex	
<b>C</b>	21	-	Zytoplasma, Zellkern	negative Regulation der Replikation	<b>Nicht-Strukturproteine</b>
<b>V</b>	40	-	Zytoplasma	negative Regulation der Replikation	

### ***1.1.5 Replikation und Genomaufbau***

Bei der **Adsorption**, dem ersten Schritt im Replikationszyklus, bindet das H-Proteins an den zellulären Rezeptor. Durch diese Bindung nähern Virus- und Zellmembran sich einander nahe genug an, um zu fusionieren. Nach einer Konformationsänderung H-Rezeptorkomplexes wird das F-Protein aktiviert und die Fusion eingeleitet. Der Fusionsmechanismus ermöglicht eine vom pH-Wert unabhängige Aufnahme der viralen RNA, und außer der Fusion scheinen keine weiteren Faktoren für die Virusaufnahme nötig zu sein.

Anschließend folgt der Schritt der **Penetration**, bei dem das Nukleokapsid in das Zytoplasma entlassen wird, und das sogenannte **Uncoating**, das Freisetzen der viralen RNA aus dem Nukleokapsid (Modrow und Falke, 2003). Die RNA gelangt auf noch ungeklärte Weise in Kernnähe, wo die **Transkription** beginnt, bei der die (-)-RNA des MV-Genoms in m-RNA umgeschrieben. Dadurch wird die **Translation**, sprich die Synthese der Virusproteine, an den Ribosomen der Zelle ermöglicht. Neben der Transkription wird auch die **Replikation** eingeleitet, die der Vervielfältigung des Genoms zur Produktion neuer Viren dient.

Das Genom des Masernvirus besteht aus einer einzelsträngigen (-)-RNA, die ca. 16.000 Nukleotiden enthält und in sechs Genregionen gegliedert ist. Diese Regionen kodieren die viralen Proteine. Abbildung 4 zeigt den schematischen Aufbau des MV-Genoms.



**Abbildung 4: Schematische Darstellung des MV-Genoms.**

Die Proteine (schwarz) sind in drei offenen Leserastern kodiert. Das Genom beginnt mit einer Leadersequenz (grau). Die Transmembranregionen der F- und H-Proteine sind gestrichelt dargestellt. Die Pfeile zeigen den Transkriptionsgradienten.

Am 3'-Ende des Genoms befindet sich eine als Leader bezeichnete Sequenzfolge von 35 Basen, die nicht für Aminosäuren kodiert. Der Leadersequenz folgen die proteinkodierenden Sequenzen in der Reihenfolge 3'-N-P/C/V-M-F-H-L-5', die in drei Leserastern kodiert sind. Die Leadersequenz dient der Anlagerung des Polymerasekomplexes und damit der Initiation der Transkription. Anschließend rückt die Polymerase weiter bis zum Anfang des N-Gens und beginnt mit der Polymerisation der m-RNA. Zwischen den proteinkodierenden Sequenzen befinden sich jeweils kurze intergenische Sequenzen, die nicht für Proteine kodieren. Diese Konsensussequenzen

sind konservierte Tripeptide mit der Sequenz C-U/G-U. Das Überspringen dieser Sequenzen und ein erneuter Transkriptionsstart führt zu 6 verschiedenen m-RNAs, die „gecappt“ und polyadenyliert werden. Bedingt durch die intergenischen Sequenzen kann es nach der Transkription eines Gens auch zu einem Abbruch der Transkription kommen. Je weiter ein Protein vom 3`-Ende entfernt ist, desto wahrscheinlicher wird eine verfrühte Termination. Es entsteht dadurch ein Transkriptionsgradient, der zur Synthese einer großen Anzahl von N-Protein, aber von nur wenig L-Protein führt (Cattaneo *et al.* 1987; Schneider-Schaulies S *et al.* 1990).

Die Translation wird durch die RNA-Modifikationen mit Hilfe des zellulären Translationsapparats ermöglicht. Auch die weiteren Modifikationen des F- und H-Proteins beruhen auf zellulären Mechanismen und finden im ER und im Golgi-Apparat statt.

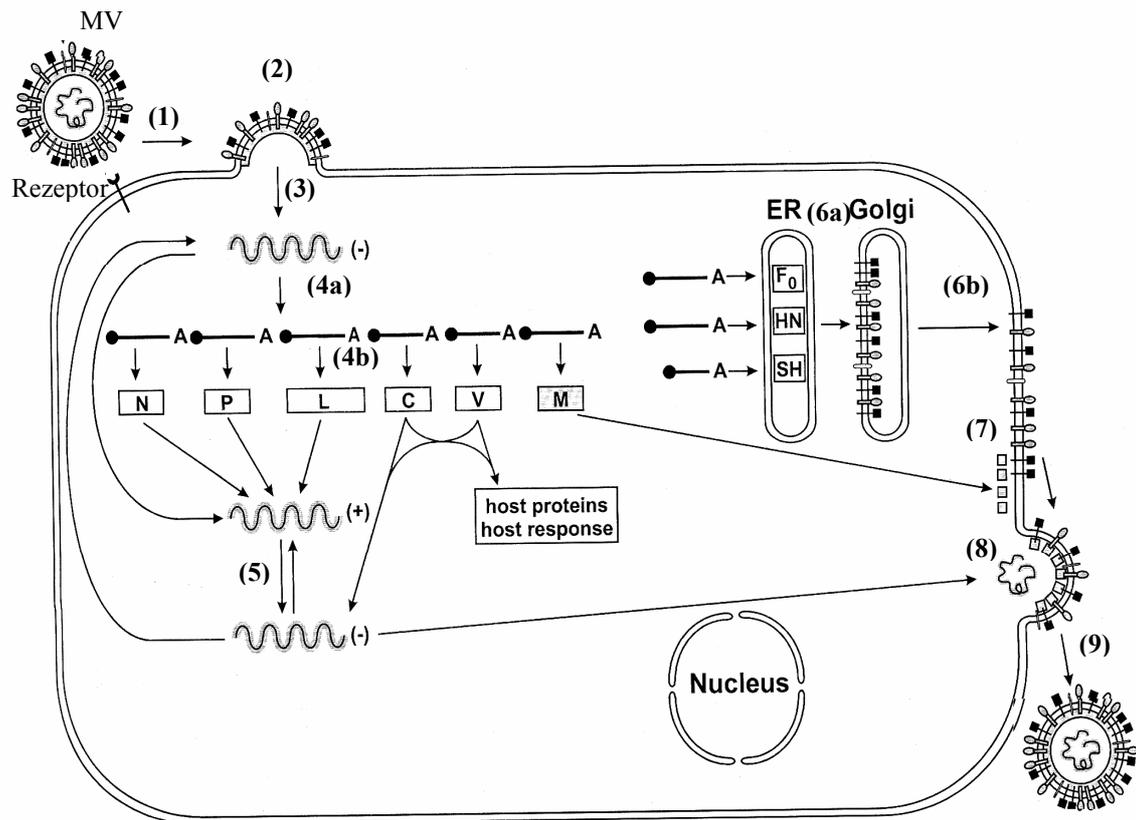
Die Umschaltung von der Transkription auf die Replikation des Genoms erfolgt, sobald eine ausreichende Menge an N-Protein im Zytoplasma zur Verfügung steht. Indem das N-Protein sich an die RNA anlagert, bewirkt es eine Antitermination an den Stop-Sequenzen der Proteine (Blumberg *et al.* 1981). Unterstützt wird die Antitermination durch eine Komplexbildung der N und P-Proteine, die durch Wechselwirkungen mit dem L-Protein die Entstehung des Antigenoms fördert. Auf diese Weise entsteht ein kontinuierliches RNA-Molekül in Positivstrangorientierung, das Voraussetzung ist für die Bildung eines neuen Virusgenoms. Um eine Rücktranskription der antigenomischen Transkripte zu ermöglichen, wird die gesamte (+)-RNA mit N-Protein als Ribonukleoprotein verpackt.

Für die Bildung neuer infektiöser Viren bindet der Minusstrang-RNP-Komplex mit P- und L-Proteinen. Daran wiederum lagert sich das M-Protein an, welches gleichzeitig die RNA-Synthese inhibiert. Anschließend bindet das M-Protein nichtkovalent an die zytoplasmatischen Anteile der F- und H-Proteine in der Plasmamembran und setzt so den als **Budding** bezeichneten Sprossungsprozess in Gang. Während des Buddings fusionieren die neu gebildeten Nukleokapside mit der Zytoplasmamembran und erhalten so ihre Hülle.

Für polarisierte Epithelzellen ist bekannt, dass der zelluläre Rezeptor CD46 bevorzugt apikal lokalisiert ist. Somit tritt das MV auf der apikalen Seite in die Wirtszelle ein, während H und F sowohl auf der apikalen als auch auf der basolateralen Seite der

Zytoplasmamembran erscheinen und dort das Budding bzw. die Zell-Zell-Fusion einleiten (Blau and Compans 1995).

Den Replikationszyklus der Paramyxoviren, zu denen auch das Masernvirus zählt, zeigt Abbildung 5.



**Abbildung 5: Replikationszyklus der Paramyxoviren.**

[aus: Fields, Virology, 4th Edition, 2001, S. 1325]

(1) Adsorption. (2) Fusion der Virus- mit der Wirtszellmembran, Penetration und Uncoating. (3) Freisetzung des MV-Genoms. (4 a) Transkription: das 5'-Ende der m-RNA wird durch den Punkt gekennzeichnet, das 3'-Ende mit A. (4 b) Translation. (5) Replikation. (6 a) Modifizierung der MV-Proteine im Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat. HN entspricht beim MV dem H-Protein, SH wird bei Morbilliviren nicht exprimiert. (6 b) Einbau der MV-Proteine in die Zytoplasmamembran. (7) Assoziation der M-Proteine mit membranärem H und F. (8) Zusammensetzen der infektiösen Partikel. (9) Budding und Freisetzung neuer Viren.

## 1.2 Zelluläre Grundlagen

### 1.2.1 Zelluläre Rezeptoren für das Masernvirus

1993 wurde von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen auf unterschiedlichen Wegen CD46 als MV-Rezeptor identifiziert (Dorig *et al.* 1993; Nanche *et al.* 1993).

Neben CD46 wurde erstmals im Jahre 2000 SLAM (= Signaling Lymphocyte Activation Molecule, oder auch CD150) als weiterer MV-Rezeptor insbesondere für Wildtypisolate beschrieben (Tatsuo *et al.* 2000) und nur wenig später durch eine andere Art der Identifizierung als MV-Rezeptor bestätigt (Erlenhoefer *et al.* 2001).

#### CD46 ODER MCP

MV-Impfstämme binden das Oberflächenprotein CD46 (oder MCP, Membran-Kofaktor-Protein), das zur Proteinfamilie der Komplementrezeptoren (regulators of complement activation = RCA) gehört.

CD46 schützt die körpereigenen Zellen vor Zerstörung durch das Komplementsystem. Sein Fehlen auf der Zelloberfläche führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Zelle gegenüber Angriffen durch das Komplementsystem (Schnorr *et al.* 1995).

Der Rezeptor wird ubiquitär auf allen humanen Körperzellen exprimiert, mit Ausnahme der Erythrozyten. Die höchste Rezeptordichte zeigen Epithelzellen, dann folgen Granulozyten und Lymphozyten (Seya *et al.* 1990). Bei einigen Zellen des ZNS wird hingegen nur sehr wenig bis kein CD46 gefunden (Ogata *et al.* 1997).

Das CD46-Gen enthält 14 Exons. Exon 1 kodiert für die Signalsequenz (leader), gefolgt von den 4 Komplement-Kontroll-Protein Domänen (CCP 1-4, 251 AS), die von den Exons 2-6 kodiert werden. Die Exons 7-9 kodieren für die ein bis drei O-glykosylierten und Serin-Threonin-Prolin-reichen Domänen (STPA, STPB, STPC, 44 AS). Das Exon 10 kodiert für eine Sequenz mit unbekannter Signifikanz (13 AS). Exon 11-12 kodieren für die Transmembran-Domäne (34 AS) und die Exons 13-14 schließlich für den zytoplasmatischen Schwanz, der durch alternatives Spleißen in zwei Varianten exprimiert werden kann (Cyt1 mit 16 AS und Cyt2 mit 23 AS).

Die Bindungsstellen des Maservirus befinden sich an den äußeren Komplement-Kontroll-Protein-Domänen SCR1+2. Die Bindung der Komplementfaktoren geschieht über die SCR2-4-Domänen. Die SCR1+2 Domänen von CD46 sind notwendig und auch ausreichend für den MV-Eintritt in die Zelle (Manchester *et al.* 1995; Manchester *et al.* 2000).

Während einer MV-Infektion bindet das H-Protein an CD46 und kann dann rezeptorvermittelt in die Zelle gelangen (Buchholz *et al.*, 1996; Devaux *et al.* 1996; Maisner *et al.* 1994; Manchester *et al.* 1994). Abhängig vom benutzten MV-Stamm wird das CD46-Protein nach Kontakt mit Viruspartikeln oder infizierten Zellen von der Zelloberfläche herunterreguliert (Krantic *et al.* 1995; Naniche *et al.* 1993; Schneider-Schaulies *et al.* 1995a+b). Für diese sogenannte Downregulation sind die gleichen SCR-Domänen verantwortlich, die auch die Virusbindung ermöglichen .

Jeder Mensch exprimiert mehrere höhermolekulare und mehrere niedermolekulare Isoformen des CD46, und das Verhältnis der Expressionsmenge dieser beiden Isoformen zueinander wird autosomal dominant vererbt. Alle Isoformen sind in der Lage, als Rezeptor zu fungieren (Gerlier *et al.* 1994; Manchester *et al.* 1994; Varior-Krishnan *et al.* 1994).

Weil CD46 auf allen Zellen (mit Ausnahme der Erythrozyten) von Menschen und Affen exprimiert wird, lassen sich entsprechende Zelllinien mit MV-Impfstämmen infizieren (Dorig *et al.* 1994).

## CD150 ODER SLAM

Erst kürzlich wurde ein weiterer zellulärer Rezeptor identifiziert, das ko-stimulatorische SLAM-Protein bzw. CD150. Dabei handelt es sich um ein glykosyliertes Transmembranprotein vom Typ I, das auf der Oberfläche immunkompetenter Zellen, sprich auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, Gedächtniszellen und aktivierten dendritischen Zellen und aktivierten Makrophagen exprimiert wird (Cocks *et al.* 1995; Ogimoto *et al.* 2001; Punnonen *et al.* 1997). CD150 gehört zur CD2-Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie, die zwei typische extrazelluläre Domänen aufweist: Eine

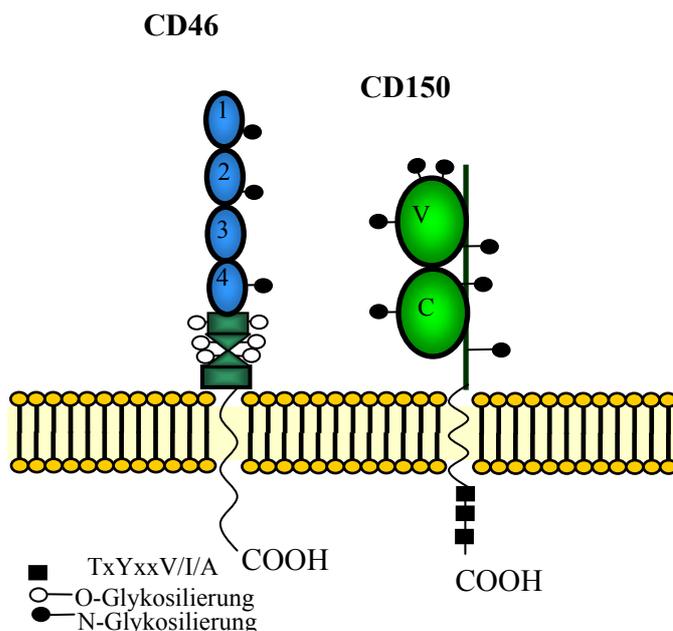
Konstante (C), sowie eine den variablen Domänen der Ig-Moleküle ähnliche V-Domäne. Ono *et al.* konnten 2001 zeigen, dass MV an die V-Domäne bindet.

Aufgebaut ist der Rezeptor aus einer 27 Aminosäure langen hydrophoben Leader Sequenz, einer 202 AS langen extrazellulären Region, die 8 potentielle N-Glykosylierungsstellen enthält, sowie einer 77 AS großen zytoplasmatischen Domäne.

Die Bindung von SLAM verstärkt die T-Zell-Proliferation und löst die Produktion von IFN- $\gamma$  aus (Aversa *et al.* 1997a+b; Cocks *et al.* 1995). Bei B-Zellen fördert die SLAM-Bindung die Proliferation und die Synthese und Sekretion von Immunglobulinen (Punnonen *et al.* 1997). Die biologische Wichtigkeit von SLAM wird dadurch unterstrichen, dass Mutationen in oder Deletionen von SLAM assoziierten Protein (SAP) einen schweren Immundefekt, die X-gekoppelte Lymphoproliferative Erkrankung (XLP), hervorrufen (Nichols 2000; Sayos *et al.* 1998).

Folglich ist CD150 verantwortlich für den Lymphtropismus der Morbilliviren sowie für ihre immunsuppressive Wirkung. Untersuchungen haben gezeigt, dass CD150 sowohl die Virusaufnahme als auch die Synzytienbildung vermittelt (Erlenhoefler *et al.* 2001; Erlenhoefler Dissertation, 2002). Auch dieser Rezeptor wird in infizierten Zellen downreguliert. An ihn binden sowohl Impfstämme als auch Wildtypstämme des MV.

Der Aufbau beider zellulären Rezeptoren ist in Abbildung 6 skizziert.



**Abbildung 6: Aufbau der zellulären Rezeptoren CD46 und CD150.**

[aus: Erlenhoefler, Dissertation 2002]

CD46 wird aus vier N-glykosylierten SCR (1-4) sowie aus O-glykosylierten STP-Domänen gebildet. Die Bindungsstellen des Maservirus befinden sich an den äußeren SCR1+2 Domänen. Die Bindung der Komplementfaktoren geschieht über die SCR2-4-Domänen.

CD150 enthält eine variable Domäne (V), an die das MV bindet, und eine konstante Domäne (C). Beide sind N-glykosyliert.

Die Verankerung beider Rezeptormoleküle in der Zytoplasmamembran erfolgt über Transmembrandomänen am carboxyterminalen Ende.

### 1.2.2 Das Zytoskelett

Das Zytoskelett der menschlichen Zellen wird durch drei zytoplasmatische Filamentsysteme, zu denen die Mikrotubuli, die Intermediärfilamente und das Aktin zählen, und zwei membrangebundene Filamentnetzwerke, Spektrin und Laminin, gebildet. Gemeinsam sichern sie Statik und Dynamik der Zelle. Zu den statischen Funktionen zählen Formung und Aufrechterhaltung der Zellgestalt, da Zytoplasma und Plasmamembran allein mechanisch instabil sind. Dynamische Aufgaben sind die Bewegung sowohl der Zelle an sich als auch der Strukturen innerhalb der Zelle. Grundlage aller Funktionen ist die Fähigkeit der Zytoskelettproteine zur Selbstpolymerisation, bei der Proteinuntereinheiten sich eigenständig aneinander lagern und so die als Filamente bezeichneten Proteinketten ausbilden.

Zusätzlich zu den Zytoskelettproteinen im engeren Sinne existieren spezielle Begleitproteine, welche die Polymerisation regulieren und Verbindungen zu anderen Zellstrukturen und Filamentsystemen herstellen.

Jede der Zytoskelettbestandteile besitzt eine charakteristische Verteilung in der Zelle (siehe dazu Abbildung 7): Die Mikrotubuli durchziehen von einem Zentrum in Kernnähe aus sternförmig alle Kompartimente des Zellinneren, wohingegen die Aktinfilamente sich in Nähe der Plasmamembran konzentrieren und eine rindenähnliche Schicht bilden. Die Intermediärfilamente wiederum spannen sich netzartig durch das gesamte Zytoplasma und sind in den Proteinen der Zell-Zell-Verbindungen verankert.

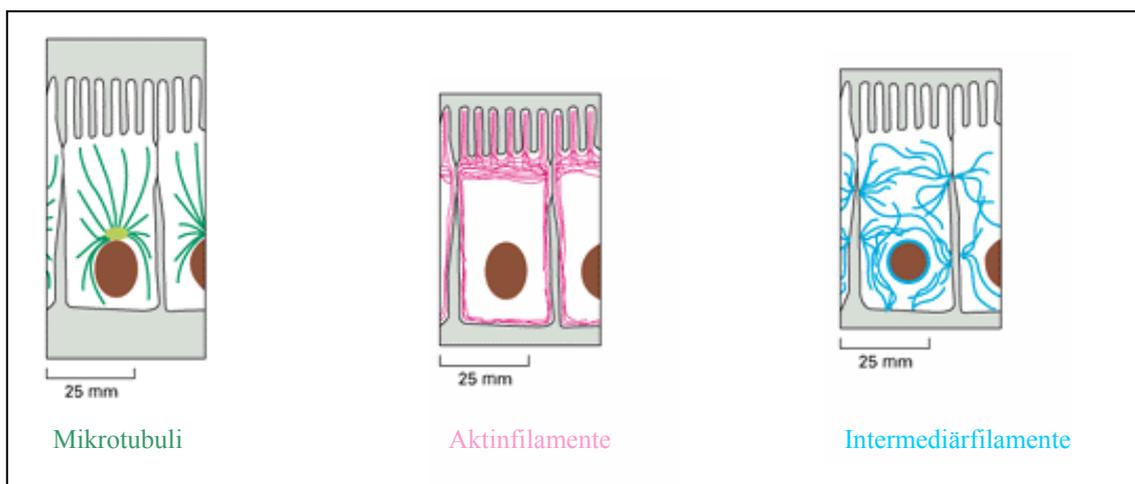


Abbildung 7: Verteilung der zytoskelettären Filamentsysteme in der Zelle.

## MIKROTUBULI

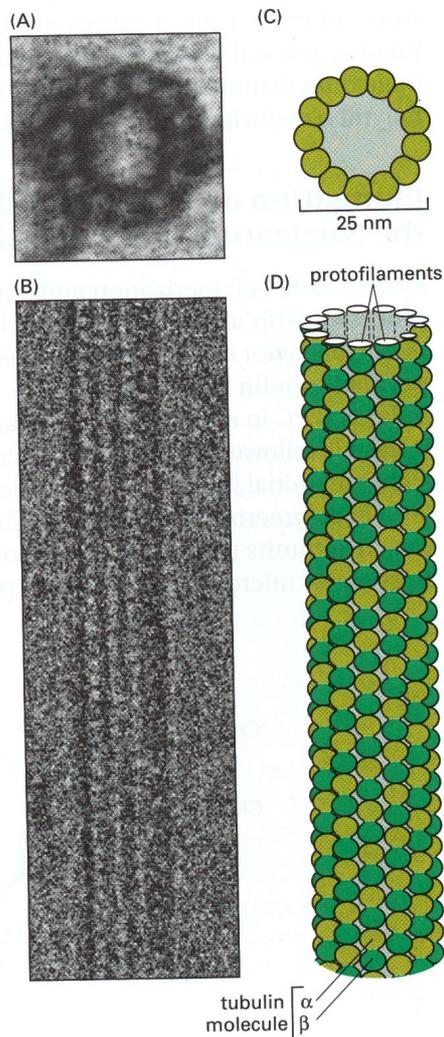
Mikrotubuli (MT) sind lange tubuläre Einzelfilamente und mit einem Durchmesser von 25 nm die kräftigste Komponente des Zytoskeletts. Sie ermöglichen den gerichteten Transport von zellulären Vesikeln, sie verteilen die Chromosomen während der Mitose gleichmäßig auf beide Tochterzellen und können die Zelle polarisieren.

MT bestehen aus den globulären Polypeptiden  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin, die sich fest miteinander verbinden und so die Baueinheit der Mikrotubuli, das Tubulindimer bilden (Chiu 1997). Vom Tubulin sind zahlreiche Isoformen bekannt, in Säugetierzellen gibt es zumindest 6 verschiedene  $\alpha$ - und eine ähnliche Anzahl  $\beta$ -Tubuline, von denen jedes von einem eigenen Gen kodiert wird. Sie unterscheiden sich leicht in Funktion und Lokalisation, können jedoch miteinander polymerisieren. Beispielsweise kommt  $\beta_1$ -Tubulin nur in Blutzellen vor, wohingegen die Isoform  $\beta_4$  im Nervensystem zu finden ist.

Durch die Polymerisation der Heterodimere entstehen lange Tubulinketten, sogenannte Protofilamente. Das Protofilament ist eine polarisierte Struktur mit einem positiven und einem negativen Ende. Positiv (+) bedeutet, dass die Polymerisation mit hoher Geschwindigkeit erfolgt und somit das Wachstum dominiert, während das Tubulin am negativen (-)Ende langsam polymerisiert und daraus das Überwiegen des Abbaus resultiert.

13 Protofilamente bilden einen Ring um einen zentralen Kern, der elektronenmikroskopisch leer erscheint, und damit die zylindrische Wand des Mikrotubulus. Da sich die Protofilamente in ihrer Polarität parallel anordnen, besitzt auch der Mikrotubulus ein (+)- und ein (-)Ende. Benachbarte Tubulindimere werden dabei gegeneinander versetzt arrangiert, so dass eine helikale Grundstruktur entsteht.

Zur besseren Vorstellung zeigt Abbildung 8 den Aufbau eines Mikrotubulus.



**Abbildung 8: Mikrotubulus.**

[aus: **Molecular Biology of the Cell, 3rd edition, 1994, S. 803**]

(A) zeigt den elektronenmikroskopischen Schnitt durch einen Mikrotubuluszylinder. Jeder kleine Kreis entspricht einem Tubulindimer. (B) zeigt denselben Schnitt schematisch.

(C) und (D) zeigen die Anordnung der Protofilamente in Längsrichtung.

Das Zentrum des Mikrotubuliwachstums ist das MTOC (= microtubule-organizing center), auch Zentrosom genannt. Seine Bestandteile sind spezifische Proteine, unter anderem eine besondere Unterform des Tubulins, das  $\gamma$ -Tubulin. Vermutlich interagiert es mit dem  $\alpha$ - und  $\beta$ -Tubulin und hilft bei der als Nukleation bezeichneten Oligomerbildung der de-novo-Synthese freien Tubulins (Mitchinson and Kirschner 1984).

Das MTOC wird aus zwei Zylindern geformt, die sich rechtwinklig in einer L-Konfiguration gruppieren, und befindet sich während der Interphase des Zellzyklus

nahe der äußeren Kernmembran. Durch Teilung können zwei Zentrosomen bzw. Spindelapparate entstehen, die während der Mitose für die korrekte Verteilung der Chromosomen auf die Tochterzellen verantwortlich sind. Neue Heterodimere werden immer am (+)-Ende der Protofilamente angefügt, und so sind die (-)-Enden sinnvoller Weise auf das MTOC hin ausgerichtet.

In nichtpolarisierten Zellen wie Fibroblasten und Leukozyten strahlen die MT vom MTOC fächerförmig in die Zellperipherie aus, wohingegen in den polarisierten Epithelzellen kein klassisches MTOC existiert und das Minusende aller Mikrotubuli apikal liegt. Die Verteilung der MT in Neuronen ist auf deren besondere Funktionen hin ausgerichtet: Vom Zentrosom aus durchziehen sie das gesamte Axon und weisen mit ihrem Plusende auf die Synapse hin. Auf diese Weise wird der Transport von Materialien auch über lange Distanzen möglich und kann gut reguliert werden.

Voraussetzung für die Polymerisation des Mikrotubulus ist die Anwesenheit von GTP (2 Moleküle pro Dimer) und  $Mg^{2+}$ . *In vitro*-Untersuchungen mit reinem Tubulin haben gezeigt, dass zu Beginn einer de-novo-Synthese eine sogenannte Nukleation der Tubulindimere stattfindet, in der die Untereinheiten sich zuerst zu Oligomeren zusammenfügen. Da dieser Prozess langsamer verläuft als die spätere Elongation am vorgeformten Mikrotubulus, spricht man auch von der lag-Phase. In der folgenden Phase der schnellen Polymerisation wächst der Mikrotubulus exponentiell an, da die Konzentration an freiem Tubulin deutlich höher liegt als die des gebundenen. Sobald eine als kritische Konzentration bezeichnete Konzentration an freiem Tubulin erreicht wird, beginnt die Plateau-Phase, in der Auf- und Abbau sich die Waage halten.

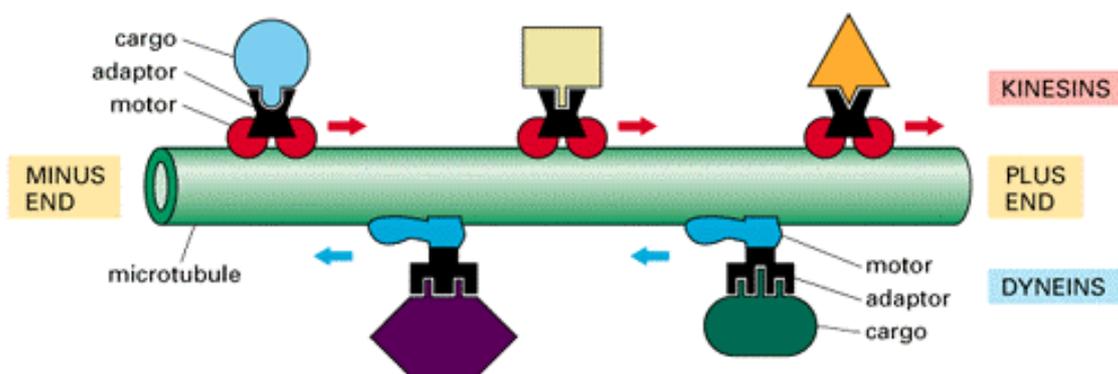
Die Halbwertszeit eines einzelnen Mikrotubulus liegt bei etwa 10min, während ein Tubulinmolekül im Schnitt länger als 20h existiert. Folglich nimmt ein Molekül an mehreren Polymerisations- und Depolymerisationsvorgängen teil. Im Allgemeinen befindet das Mikrotubulussystem einer Zelle sich in ständigem Auf- und Abbau, und dieses Prinzip wird auch als dynamische Instabilität bezeichnet. Hierfür ist Energie erforderlich, die durch die Hydrolyse von GTP gewonnen wird. GTP bindet an die  $\beta$ -Untereinheit des Tubulindimers, und beim Anfügen der Untereinheit an den Mikrotubulus wird GTP zu GDP. Bei schnellem Wachstum werden die Dimere rascher aneinander gefügt, als GTP hydrolysiert werden kann, so dass sich am (+)-Ende ein

GTP-cap ausbildet. Da die Affinität von Tubulin zu GTP höher ist als die zu GDP, fördert das GTP-cap die Polymerisation. Verliert der Mikrotubulus sein GTP-cap, beginnt er zu depolymerisieren. Folglich ist die Hydrolyse des GTP nicht nur Voraussetzung für die Polymerisation, sondern auch ein wichtiger Regulationsmechanismus für die dynamische Instabilität (Kirschner and Schulze 1986, Drechsler and Kirschner 1994).

Die Stabilisation der MT an ihrem (+)-Ende ist unter anderem wichtig für eine Polarisation der Zelle, wie es beispielsweise in Epithelien der Fall ist. Ferner ist die Dynamik der MT charakteristisch für den Zelltyp: Das mikrotubuläre System in Epithelzellen ist weitaus stabiler als in Fibroblasten (Pepperkok *et al.* 1990), und die dynamische Instabilität wird auf zelltyp-spezifische Weise reguliert (Shelden and Wadsworth 1993).

Neben Ausbildung des GTP-caps können posttranslationale Modifikationen der Tubulinuntereinheiten den Mikrotubulus stabilisieren (Bulinski and Gundersen 1991). Darüber hinaus bewirkt die Bindung von sogenannten Mikrotubulus-Assoziierende Proteine (MAP) an eben diesen modifizierten Regionen eine weitere Stabilisierung des Tubulins. Daneben können die MAP auch destabilisierend wirken.

Andere MAPs dienen als Motorproteine und transportieren Zellorganellen und andere Partikel entlang der Mikrotubuli. Aufgrund der Existenz separater Minusend- (Dynein) und Plusendmotorproteine (Kinesin) ist dieser Transport gerichtet (siehe auch Abbildung 9).



**Abbildung 9: Mikrotubulärer Transport mittels Motorproteine.**

[aus: *Molecular Biology of the Cell*, 3rd edition, 1994. S. 792]

Kinesine transportieren Vesikel zum Plusende, Dyneine zum Minusende der Mikrotubuli.

Beispielsweise werden so Proteine nach ihrer Synthese vom ER entlang der MT zum Golgi-Apparat gebracht (Hirokawa 1998). Des Weiteren sind die Motorproteine an der Regulation des apikalen und basolateralen Transports in den polarisierten Epithelzellen beteiligt (Lafont *et al.* 1994).

## INTERMEDIÄRFILAMENTE

Die Größe der Intermediärfilamente liegt mit einem Durchmesser von 8-10 nm zwischen der Größe der Mikrotubuli und der Aktinfilamente; daher stammt auch ihr Name.

Sie bestehen aus Intermediärfilamentproteinen, die eine hohe molekulare Diversität aufweisen. Unterschieden werden 6 Haupttypen (IF I-VI), die in Tabelle 2 gelistet sind.

**Tabelle 2: Typen von Intermediärfilamentproteinen.**

Typ	Protein	Vorkommen
I	saure Zytokeratine	in den meisten Epithelien und ihren Anhangsgebilden
II	neutrale/basische Zytokeratine	
III	Vimentin	Zellen mesenchymalen Ursprungs, Embryonal- und Kulturzellen
	Desmin	Muskelzellen
	saures Gliafilamentprotein (GFAP)	Gliazellen (Astrozyten und Schwann'sche Zellen)
	Peripherin	periphere Neurone
IV	Neurofilamentprotein NF-L, NF-M, NF-H	zentrale und periphere Neurone
	$\alpha$ -Internexin	zentrale Neurone
V	Lamine A, B, C	Lamina der inneren Zellkernmembran aller eukaryontischen Zellen
VI	Nestin	neuroepitheliale Stammzellen

Die variablen Abschnitte erlauben vermutlich die Bindung der verschiedenen Typen an andere Komponenten der Zelle.

Trotz ihrer Heterogenität besitzen alle Intermediärfilamentproteine konservierte Gen- und damit Proteinabschnitte, die eine Zusammenlagerung zu strukturell ähnlichen Filamenten erlauben. Die Proteinuntereinheiten sind 50 nm lange,  $\alpha$ -helikale Monomere und besitzen einen Kopf- sowie einen Schwanzteil. Durch Paarung zweier Monomere, die sich umeinander winden, entsteht ein Dimer. Aus den Dimeren bilden sich

wiederum Tetramere, in denen die Dimere um etwa die Hälfte zueinander versetzt sind. Die Viererstruktur ist die wichtigste Polymerisationseinheit der Intermediärfilamente, aus ihnen wird das  $\alpha$ -helikale Protofilament zusammengesetzt. Ebenfalls die Form einer  $\alpha$ -Helix besitzen die nächstgrößeren Einheiten, die Protofibrille und das Filament. Die Anordnung der Filamente erfolgt bevorzugt in Bündeln.

Der helikale Aufbau sämtlicher Einheiten ermöglicht die besondere Dehnbarkeit und Reißfestigkeit der Intermediärfilamente. Auf diese Weise sind sie Spannungen gegenüber relativ resistent und können die Zellstruktur bei Zug- und Druckkräften aufrechterhalten.

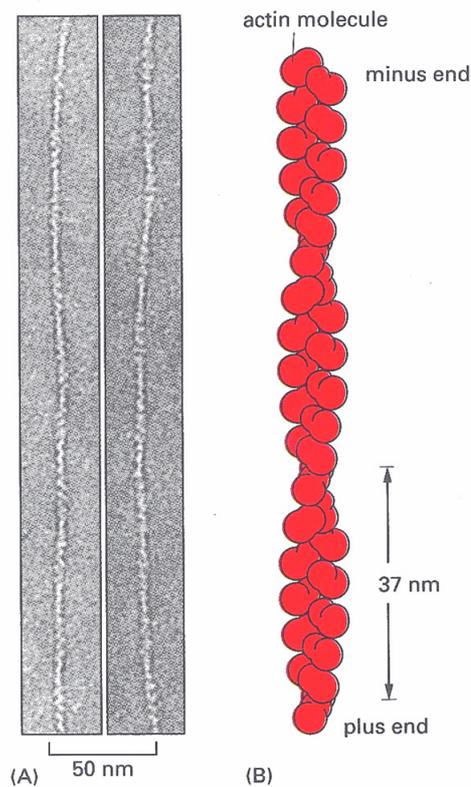
## AKTIN

Die Aktinfilamente messen 5-9 nm im Querschnitt und werden auch als Mikrofilamente bezeichnet. Mit 5-20% des zellulären Gesamtproteins ist Aktin in den meisten Zellen das quantitativ bedeutendste Protein. Der Aktinanteil der Muskelzellen liegt sogar bei mehr als 50%. Im Allgemeinen sind sie kürzer als die Mikrotubuli. Charakteristisch für die Aktinfilamente ist eine ausgeprägte Flexibilität.

Beim Menschen existieren mindestens sechs Gene für verschiedene Aktinisoformen, die sich bei der Elektrophorese in drei Hauptgruppen trennen lassen: das  $\alpha$ -,  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin. Das muskuläre Aktin gehört vorwiegend zur  $\alpha$ -Fraktion.

Das globuläre Aktinmolekül wird G-Aktin genannt. Das Aktinfilament oder F-Aktin, besteht aus zwei umeinander gewundenen  $\alpha$ -Helices, die ein aufbauendes (+)- und ein abbauendes (-)-Ende besitzen. Die Polymerisation erfolgt ähnlich wie bei den Mikrotubuli, auf die wenigen Unterschiede sei weiter unten im Text eingegangen.

Die Struktur des Aktinfilaments zeigt Abbildung 10.



**Abbildung 10: Aktin.**

[aus: **Molecular Biology of the Cell, 3rd edition, 1994, S. 821**]

(A) elektronenmikroskopisches Bild zweier Aktinfilamente in Negativfärbung.

(B) Die helikale Struktur eines Aktinfilaments.

Die räumliche Organisation Aktinfilamente variiert je nach angestrebter Funktion. Eine Vielzahl von Begleitproteinen regelt die Organisationsformen. Als Netzwerk angeordnet steigern die Aktinfilamente die Viskosität des Zytoplasmas und verfestigen es zu einer Art Gel. So wird bei wandernden Leukozyten die Flussrichtung des Zytoplasmas und dadurch die Bewegungsrichtung gesteuert. Gemischte Bündel aus Aktin und Myosin stellen das Grundgerüst für die Muskelkontraktion dar, und auch in nichtmuskulären Zellen finden sich in ähnlicher Form kontraktile Aktin-Myosin-Bündel. Hier tragen sie den Namen Stressfasern und dienen der Stabilisierung der Zelle gegenüber Zugwirkung. Eine weitere wichtige Aufgabe des Aktins ist die Formung und Stützung von zellulären Fortsätzen wie Mikrovilli und Stereozilien.

Die Organisation des Aktinskeletts bestimmt zusammen mit den Mikrotubuli die Polarität der Zelle und erhält sie aufrecht. So besitzen Epithelzellen ein stark organisiertes Zytoskelett mit stabilen Mikrotubuli und viel polymerisiertem Aktin.

Motile Zellen wie Leukozyten dahingegen ändern ihre Polarität häufig und benötigen daher ein dynamisches Zytoskelett.

Wie bereits erwähnt, sind die Aktinfilamente ebenfalls polar aufgebaut. Auch bei der Aktinpolymerisation unterscheidet man analog den Mikrotubuli eine lag-Phase von einer Phase der schnellen Polymerisation sowie einer Plateauphase. Allerdings wird diesmal nicht GTP als Energielieferant genutzt, sondern ATP (1 Molekül pro G-Aktin). Die das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau bestimmende kritische Konzentration von freiem Aktin liegt weit unter der Gesamtkonzentration an unpolymerisiertem Aktin in der Zelle, so dass es Mechanismen geben muss, die eine Polymerisation verhindern. Einer davon ist die Geschwindigkeit des ATP-ADP-Austauschs im depolymerisierten Aktin. Verlässt ein Aktinmolekül das Filament, muss es erst sein ADP gegen ein neues ATP austauschen, bevor es erneut polymerisiert werden kann. Da dieser Prozess relativ langsam vonstatten geht, bleibt die Konzentration an globulärem Aktin in der Zelle hoch. Überdies können spezielle Proteine die ADP-Bindung weiter stabilisieren und die Polymerisation regulieren. Zusätzlich kann sich das aktinbindende Protein Profilin mit G-Aktin verbinden und die Filamentbildung verhindern. Daneben kann es jedoch eine Bindung mit dem membranären Lipid Phosphatidylinositoldiphosphat eingehen, dessen Synthese bei der Stimulation durch extrazelluläre Botenstoffe gesteigert wird. Bindet also Profilin an das vermehrt angebotene Phosphatidylinositoldiphosphat, wird G-Aktin frei und kann polymerisieren. Auf diese Weise können externe Stimuli die Form des Aktinskeletts beeinflussen.

Der Auf- und Abbau des F-Aktin wird für die aktive Formveränderung der Zelle benötigt, die wiederum Grundlage für die zelluläre Teilung und Bewegung ist.

In dieser Hinsicht sei noch die Gruppe von Kappenproteinen erwähnt, deren Hauptvertreter das Gelsolin ist, und welche die Polymerisation stoppen, indem sie sich bei einer  $\text{Ca}^{2+}$ -Konzentration über  $10^{-6}$  M an das (+)-Ende der Filamente anlagern. Die verkürzte Form des Gelsolins, das Brevin, kommt im Blutplasma vor und beeinflusst die Fortbewegung der Makrophagen.

Nicht das Prinzip der dynamischen Instabilität beeinflusst die Länge des F-Aktins, sondern das sogenannte Tretmühlenprinzip. Hierbei wechseln sich Auf- und Abbau nicht durch ein GTP-cap gesteuert ab, sondern erfolgen simultan an den beiden Enden

des Aktinfilaments. Halten beide sich die Waage, tritt der Wachstumsprozess sozusagen auf der Stelle, und die Länge bleibt konstant.

### ***1.2.3 Beziehungen zwischen MV und Wirtszelle***

Mit der Adsorption treten Virus und Wirtszelle in Beziehung miteinander. Bereits für den Eintritt des MV in die Zelle sind zelluläre Faktoren notwendig, da nur die Bindung an den passenden Rezeptor eine Fusion erlaubt. Auch in den folgenden Schritten des Replikationszyklus sind die Viren immer wieder auf zelluläre Funktionen angewiesen und benötigen den Proteinsyntheseapparat der Wirtszelle zu ihrer Vermehrung.

Die Infektion durch das MV verändert die Morphologie der Zelle bis hin zu ihrem Tod, im Gegenzug jedoch beeinflussen Veränderungen der zellulären Komponenten den Ablauf des viralen Replikationszyklus.

#### **MV-INDUZIERTER VERÄNDERUNGEN DER ZELLMORPHOLOGIE**

Mit Aufnahme in die Zelle und Beginn der Replikation ändert sich nach und nach die Zusammensetzung der zellulären Komponenten. Letzten Endes führt die Infektion der Zelle mit dem Masernvirus zu ihrem Absterben und wird daher auch zytozidal genannt. Die virusbedingte Zellschädigung ist die biologische Grundlage der in Kapitel 1.1.2 aufgeführten Krankheitssymptome.

Die aus einer Virusinfektion resultierenden Veränderungen werden unter dem Begriff des zytopathischen Effekts (CPE) zusammengefasst. Am besten erkennbar ist der CPE in Zellkulturen, die einschichtig als sogenannte Zellrasen oder auch Monolayer wachsen. Eine MV-Infektion führt zu typischen zytopathischen Veränderungen des Zellrasens: zur Synzytienbildung, zur Abkugelung der Zelle und zu Einschlusskörpern.

Die F-Protein induzierte Fusion der Zellmembranen einer infizierten Zelle mit seinen Nachbarzellen führt zur Bildung einer mehrkernigen Riesenzelle, dem Synzytium. Durch Apoptose dieser Zellen entstehen im Monolayer sogenannte Plaques.

Außerdem verändert die Infektion die Form der Zelle, die ihre normale polygonale Gestalt verliert und sich sternförmig, dendritisch oder spindelförmig darstellt. Ursache

ist die Freisetzung von Proteasen aus den Lysosomen, die das Zytoskelett zerstören und damit die Struktur der Zelle auflösen. In der Zellkultur wird eine Abkuglung und Ablösung vom kultivierten Zellrasen sichtbar.

Die Einschlusskörper befinden sich bei MV-Infektion vor allem intranukleär und enthalten Nukleokapside. Der Transport der Virusproteine geschieht wahrscheinlich aktiv und wird durch Proteine der Wirtszelle vermittelt (ter Meulen *et al.* 1983). Die Einschlusskörper erscheinen erst in späten Stadien und sind unter anderem ein Charakteristikum der SSPE.

Man unterscheidet mehrere Mechanismen, die zur Zellschädigung führen. Zum einen kann die Infektion durch das Virus selbst zur Lyse und damit zur Nekrose der Wirtszelle führen, zum anderen leitet die infizierte Zelle selbst die Apoptose ein. Des Weiteren werden die Wirtszellen des MV durch das Immunsystem angegriffen und zerstört. Während die Nekrose ein passiver Vorgang ist, bei dem die Zelle durch Verlust der Membranfunktion anschwillt und schließlich platzt, ist die Apoptose ein aktiver Zelltod. Ihr Ablauf ist fest programmiert und kann durch verschiedene Signale ausgelöst werden, in diesem Fall durch das Auftauchen viraler Proteine im Zytoplasma. Letztlich bewirkt eine DNA-Fragmentierung durch das Enzym Endonuclease eine Schrumpfung des Zellkerns, die in die Auflösung der Zelle mündet.

## EINFLUSS ZELLULÄRER PROTEINE AUF DIE MV-REPLIKATION

Zwischen den Paramyxoviren und dem Zytoskelett können verschiedene Interaktionen beobachtet werden, an denen insbesondere die Aktinfilamente und die Mikrotubuli beteiligt scheinen.

Aktin assoziiert mit Proteinen des MV, vor allem mit dem Matrixprotein (Guiffre *et al.* 1982) und dem Nukleokapsid (Moyer *et al.* 1990). Dabei dient das M-Protein der Erkennung durch das F-Aktin (Guiffre *et al.* 1982) und ermöglicht so eine Bindung an N. Indem Aktin erst nach Ende der RNA-Synthese an Nukleokapside bindet, wird wahrscheinlich sicher gestellt, dass nur nicht replizierende, reife Nukleokapside zur Plasmamembran transportiert werden (Moyer *et al.* 1990; Cudmore *et al.* 1997). Der Transport selbst erfolgt durch Wachstum am (+)-Ende des Aktinfilaments in Richtung

der Zytoplasmamembran, wo anschließend das Budding statt findet (Cudmore *et al.* 1997). Unterstützt wird diese Theorie durch die Tatsache, dass nach dem Budding Aktinbruchstücke in den Virionen zu finden sind (Bohn *et al.* 1986), während andere Komponenten des Zytoskeletts fehlen (Burke *et al.* 1998).

Experimente mit Cytochalasin B, einem aktindestabilisierenden Agens, verhinderten die Zusammensetzung der Viruskomponenten zu neuen infektiösen Partikeln und führten zu einer Akkumulation von Nukleokapsiden in der Zelle (Stallcup *et al.* 1983).

Ferner ist bekannt, dass die laterale Mobilität von MV-Glykoproteinen in der Wirtszellmembran von ihrer Assoziation mit dem Zytoskelett abhängt (Lydy *et al.* 1990). Aktin scheint eine Mediatorfunktion zwischen den intrazellulären Nukleokapsiden und den viralen Membranproteinen zu besitzen.

Zelluläre Proteine spielen außerdem eine wichtige Rolle bei der Synthese der viralen mRNA. Erste Erkenntnisse lieferten die Experimente der Arbeitsgruppe von Moyer, die eine Stimulation der *in vitro*-Transkription des MV durch einen Extrakt des Zytoplasmas nichtinfizierter Zellen fest stellte (Moyer *et al.* 1988; Moyer *et al.* 1990). Dabei ist Tubulin zumindest einer der stimulierenden Faktoren, da die Transkription zum einen durch monoklonale anti-Tubulin-Antikörper verhindert und zum anderen durch Zugabe reinen Tubulins gefördert wird (Moyer *et al.* 1988; Moyer *et al.* 1990). In Anbetracht der Tatsache, dass bei Verwendung des anti-Tubulin-Antikörpers eine Ko-Präzipitation von L-Protein des Masernvirus und Tubulin auftritt, agiert Tubulin vermutlich als eine Untereinheit der viralen RNA-abhängigen RNA-Polymerase (Moyer *et al.* 1988; Moyer *et al.* 1990). Einer anderen Theorie zufolge aktiviert Tubulin die RNA-Polymerase, da die saure NH<sub>2</sub>-Region des P-Proteins des Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) durch Tubulin ersetzt werden kann, ohne dass die Transkription beeinträchtigt wird (Chattopadhyay and Bannerjee 1988). Auch eine Verankerung des Transkriptions-/Replikationskomplexes durch Tubulin wurde vorgeschlagen (Hamaguchi *et al.* 1985).

Demnach scheint Tubulin als Kofaktor der RNA-Polymerase erforderlich für die Replikation des MV zu sein, während Aktin die Nukleokapside zur Zellmembran transportiert und damit für die Freisetzung der neu synthetisierten Viren benötigt wird.

Aber auch Tubulin mag für den Transport viraler Proteine zur Zellmembran notwendig sein. In Versuchen mit dem Sendai Virus, das ebenfalls zu den Paramyxoviren gehört, wurde entdeckt, dass der apikale Transport der Glykoproteine F und HN (Hämagglutinin/Neuraminidase, entspricht dem H-Protein des MV) von einer intakten Mikrotubulusfunktion abhängt, und dass die Zerstörung der Mikrotubuli zu ungerichtetem und bipolarem Budding führt (Tashiro *et al.* 1993).

Entgegengesetzt den Veröffentlichungen, die dem Aktin eine wichtige Rolle während der Infektion zugestehen, stehen die Ergebnisse anderer Autoren. 1979 berichteten Griffin und Compans, dass F-Aktin nicht für die Bildung funktionstüchtiger Viruskomponenten benötigt wird und dass die Reifung umhüllter Viren nicht vom Zytoskelett abhängt (Griffin and Compans 1979). Weitergehende Experimente von Moyer und Horikami unterstützten diese Theorie für VSV (Vesicular Stomatitis Virus) und Influenza, bestätigten aber wiederum, dass die Wirtszellproteine bei einer Infektionen mit Paramyxoviren benötigt werden (Moyer *et al.* 1990). Zu anderen Erkenntnissen gelangte die Arbeitsgruppe von Paul Duprex, die keine Erhöhung von Aktin, Tubulin oder Vimentin in mit Masern infizierten Astrozyten feststellen konnte (Duprex *et al.* 1999). Auch bemerkten sie keine engere Verbindung zwischen dem RNP-Komplex des MV und Aktin. Einzig eine Zerstörung des Netzwerkes von GFAP, dem zu den Intermediärfilamenten gehörigen sauren Gliofilamentprotein, war erkennbar.

Im Grunde ist sich die Literatur nicht einig, auch wenn die Mehrheit der bisherigen Untersuchungen dafür spricht, dass das Zytoskeletts eine nicht unbedeutende Rolle bei der Infektion mit dem Masernvirus spielt.

Zusätzlich bleibt unklar, ob die beobachtbaren Veränderungen des Zytoskeletts aktiven Ursprungs sind, um die Virusreplikation zu fördern, oder ob sie nur eine Folge der Infektion sind, ohne einen eigenen Einfluss auf die Replikation zu haben.

### 1.2.4 Die mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMC)

Im menschlichen Blut gibt es drei große Zellpopulationen: Die Erythrozyten, die Thrombozyten und die Leukozyten. Letztere können nochmals unterteilt werden in die Gruppe der Granulozyten, die Gruppe der Monozyten und die der Lymphozyten (siehe auch Tabelle 3). Bei den Lymphozyten unterscheidet man weiterhin eine B- von einer T-Zelllinie, die beide an der spezifischen Immunabwehr beteiligt sind. Dabei liegt die Aufgabe der B-Zellen in der humoralen Abwehr, sprich in der Antikörperproduktion, während T-Zellen Bestandteil der zellulären Immunantwort sind. Komponenten des unspezifischen Immunsystems sind die Granulozyten und die Monozyten.

Unter der Bezeichnung PBMC (peripheral blood mononuclear cells) fasst man diejenigen Zellen zusammen, die einen monomorphen Kern besitzen und im peripheren Blutkreislauf vorkommen, sprich die Monozyten und die Lymphozyten.

**Tabelle 3: Zellen des menschlichen Blutes.**

Zellpopulationen und ihre Untergruppen		
Erythrozyten		
Thrombozyten		
Leukozyten	Granulozyten	Neutrophile
		Basophile
		Eosinophile
	Monozyten*	
	Lymphozyten*	T-Zellen
B-Zellen		

Die mit \* gekennzeichneten Zellen bilden die Gruppe der PBMC.

Neben Endothel- und Epithelzellen gehören auch die mononukleären Zellen zu den Zielzellen des Masernvirus. Wie bereits beschrieben findet eine bedeutende Virusreplikation in den lymphatischen Organen und Geweben statt, die über verschiedene Mechanismen zu einer Lymphopenie führt. Während der zweiten virämischen Phase und noch eine Woche nach dem Exanthem, das den Beginn der Immunantwort markiert, kann infektiöses Virus aus den PBMC isoliert werden, während das Plasma virusfrei ist (Gresser and Chany 1963; Forthal *et al.* 1992). Virale RNA ist sogar noch 11 Tage bis 3 Wochen nach Exanthembeginn nachweisbar (Hyypia *et al.* 1985; Schneider-Schaulies *et al.* 1991).

Mononukleäre Zellen werden nachweislich mit MV infiziert, polymorphkernige Zellen, zu denen die Granulozyten gehören, dagegen nicht (Sullivan *et al.* 1975). Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass die Fraktion der Monozyten den Großteil der mit MV infizierten PBMC ausmachen (Esolen *et al.* 1993). Neben den PBMC von Patienten mit akuten Masern enthalten auch die PBMC von SSPE-Patienten virale Antigene (Wrzos *et al.* 1979), was auf die Persistenz von MV in diesen Blutzellen und damit auf eine chronische Infektion hindeutet.

Allerdings ist die Rate der infizierten Zellen mit 20-25% an der Gesamtzahl der PBMC nicht sehr hoch. Zudem synthetisieren PBMC zwar geringe Mengen viraler RNA und Proteine, setzen jedoch keine Virionen frei. Eine Aktivierung mit Mitogenen wie Phytohämagglutinin (PHA), welche die lymphozytäre Proliferation stimulieren, kann die Infektionsrate auf über 70% steigern und erhöht zudem die Replikation des Virus, so dass aus der stillen Infektion eine produktive wird (Hyypia *et al.* 1985; Vainionpaa *et al.* 1991). Während dieser Aktivierung wandelt sich das Aktinskelett: Die eher geringe Menge an F-Aktin in den ruhenden Lymphozyten steigt, da G-Aktin polymerisiert wird (Rao 1984, Melamed *et al.* 1991). Es wird angenommen, dass die PHA-induzierte Aktinpolymerisation als Signal für die Stimulation der PBMC fungiert (Rao 1984), und dass die Proliferation von B-Lymphozyten damit zusammen hängt (Melamed *et al.* 1991).

Daneben bestimmt der Differenzierungsgrad der Monozyten die Empfänglichkeit für die Infektion mit dem Masernvirus: Untersuchungen zeigten, dass die Replikation in myelomonozytischen Vorläuferzellen produktiv verlief, in reifen Monozyten und Makrophagen jedoch eingeschränkt war (Helin *et al.* 1998).

Mit verantwortlich für die unterschiedlichen Replikationsraten scheinen zelluläre Proteine zu sein. So erhöhen Proteine, die spezifisch an die nicht kodierende 3'-Region RNA und an die positivsträngige Leader-Sequenz binden, die RNA-Synthese in der Zelle (Leopardi *et al.* 1993). Desgleichen vermag die erhöhte Produktion des Interferons IFN- $\alpha$  in infizierten PBMC sowohl Replikation als auch Freisetzung des Virus zu senken (Leopardi *et al.* 1992a). Zusätzlich fördert IFN- $\alpha$  die Zerstörung infizierter Zellen durch zytotoxische T-Lymphozyten und die Makrophagenaktivierung.

Allerdings bewirkt das MV nicht nur eine Aktivierung der immunkompetenten Zellen, sondern unterdrückt sie im weiteren Krankheitsverlauf, bis hin zu zwei Monate nach Rekonvaleszenz.

Zur Genese der Immunsuppression, die bereits 1908 von Pirquet das erste Mal beschrieben wurde, existieren verschiedene Theorien. Allen zugrunde liegt die Tatsache, dass die Maserninfektion eine Lymphopenie bewirkt. Die Reduktion der Lymphozytenzahl kommt zum einen dadurch zustande, dass das Virus selbst im Rahmen des CPE die Zellen soweit schädigt, dass sie sterben. Zum anderen verursacht die MV-Infektion einen Verlust der normalen Zellfunktionen der Monozyten. Unter anderem sinkt die Produktion des Tumor-Nekrose-Faktors TNF $\alpha$  ab, einem Aktivator der Lymphozytenproliferation (Leopardi *et al.* 1992b). Die viralen Glykoproteine H und F, die auf der Oberfläche infizierter PBMC exprimiert werden, können durch Interaktion mit zellulären Rezeptoren uninfizierter Lymphozyten deren Proliferation inhibieren (Sanchez-Lanier 1988; Yanagi *et al.* 1992; Schlender *et al.* 1996). Auch ein direkter Effekt des Virus auf die Funktion der Lymphozyten wird angenommen, da infizierte B-Zellen weniger Immunglobulin bilden als uninfizierte (McChesney *et al.* 1986).

Alles in allem ist die Beziehung zwischen dem MV und den Zellen des Immunsystems wechselseitig, denn zum einen bekämpfen die Immunzellen das Virus, zum anderen nutzt das Virus sie für seine Vermehrung und unterdrückt ihre Funktionen. Für die Medizin ist die Immunsuppression von außerordentlicher Bedeutung, da sie Ursache ist für viele der Masernkomplikationen, die unter Umständen zum Tod der Patienten führen können. Daher ist sie ein wichtiger Gegenstand der Forschung, aus der die Verwendung von PBMC nicht wegzudenken ist.

### **1.3 Ziel der Arbeit**

Die Forschung mit Masern ist nicht nur von rein wissenschaftlicher, sondern auch von einer praktisch-medizinischen Bedeutung. Solange die Ausrottung der Masern noch nicht bewerkstelligt ist und solange Menschen an ihnen erkranken, sind genaue Kenntnisse der Krankheit von großer Bedeutung. Voraussetzung für eine effektive Prävention und Therapie ist unter anderem das Verständnis der molekularen und biologischen Vorgänge der Infektion und ihrer Zusammenhänge.

In meinen Experimenten habe ich die Bedeutung des Zytoskeletts für die Infektion untersucht, genauer gesagt seiner Bestandteile Aktin und Tubulin. Neben Vero-Zellen habe ich im Hinblick auf die durch das MV hervorgerufene Immunsuppression auch Monozyten des peripheren Blutes (PBMC) verwendet.

Vorhergehende Experimente sprechen dafür, dass Aktin und Tubulin wichtig für Infektion und Ausbreitung sind; genauere Untersuchungen, insbesondere mit Tubulin, fehlen jedoch. Außerdem ist die Abhängigkeit der MV-Replikation von Aktin und Tubulin noch lange nicht zufriedenstellend bewiesen.

Daher habe ich versucht, einen Teil der Interaktionen zwischen Masernvirus und Zytoskelett zu ergründen, und zu klären, ob Eingriffe in diese Vorgänge möglich sind.

## 2 Material und Methoden

---

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Zellen und Virus

##### ZELLEN

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft	Literatur
Vero	Fibroblast (Niere)	Grüne Meerkatze ( <i>Cercopithecus aethiops</i> )	Yasumura and Kawakita 1962
PBMC	10-20% Monozyten 70-80% Lymphozyten <10% Granulozyten	Human	Böyum 1968

Vero-Zellen sind fibroblastoide Affennierenzellen der Grünen Meerkatze. Sie können bei der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen werden und waren am Institut verfügbar.

Bei der zweiten verwendeten Zellart handelt es sich um PBMC (human peripheral blood mononuclear cells). Diese mononukleären Blutzellen wurden aus heparinisiertem venösen Blut gesunder menschlicher Spender (Finnisches Rotes Kreuz) isoliert und enthalten 70-80% Lymphozyten sowie 10-20% Monozyten. Der Anteil der polymorphkernigen Zellen kann mit unter 10% vernachlässigt werden.

##### VIRUS

Bei dem für die Versuche benutzten Masernvirus handelt es sich um den auf Vero-Zellen adaptierten Wildtyp vom Halonen-Stamm (Vainionpaa *et al.* 1978) mit einem Titer von über  $5 \times 10^7$  PFU/ml. Er war am Institut vorhanden.

### **2.1.2 Antikörper**

Primärer Antikörper: MVR4-ad, polyklonaler Kaninchen-Anti-Masern.  
Am Institut hergestellt.

Sekundärer Antikörper: HRP-konjugiertes Schwein-Anti-Kaninchen-IgG (HRP: horseradish peroxidase = Meerrettichperoxidase)  
Hersteller: DAKO

### **2.1.3 Lösungen und Puffer**

#### ZELLKULTUR

Antibiotikazusatz:

50mg/ml Gentamycinsulfat	Biological Industries
BME (Basal Medium Eagle)	Gibco BRL: 31300
BSA (Rinderserumalbumin), 4%	V. Wilfrid Smith
CMC (Cellulose Gum)	Hercules: 7HF-85512
4% CMC	
in H <sub>2</sub> O	
CMC-Lösung zur Plaquetitration:	
12,5% 4%iges CMC	
12,5% Hanks (2x)	
in Zellkulturmedium	
FKS (Fötale Kälberserum)	Autogen Bioclear
Ficoll-Paque <sup>TM</sup> PLUS	Amersham Biotech

## Hanks (2x)

80g NaCl  
4g KCl  
0,6g Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> x 2H<sub>2</sub>O  
0,6g KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
1g MgSO<sub>4</sub> x 7 H<sub>2</sub>O  
10g Glucose  
0,1g Phenol-Rot  
1,4g CaCl<sub>2</sub>  
1g MgCl<sub>2</sub> x 6 H<sub>2</sub>O  
10 l H<sub>2</sub>O

## Medienküche

## Kristallviolettlösung:

5g Kristallviolettpulver  
100ml Formalin (37% HCHO)  
200ml absolutes Ethanol  
1.665ml destilliertes Wasser  
35ml 2M Tris  
10g CaCl<sub>2</sub>

Merck

## PBS (Phosphate Buffered Saline):

138mM NaCl (= 8g/l)  
2,7mM KCl (= 0,2g/l)  
6,5mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> (= 1,15g/l)  
1,5mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> (= 0,2g/l)

PBS-T:

0,05% Tween 20

Sigma: P-1379

in PBS pH 7,4

RPMI 1640

Gibco BRL: 51800-043

TPB (tryphose phosphate broth)

Difco: 0060-17-8

Trypanblau

Sigma: T-6146

## IMMUNPEROXIDASEFÄRBUNG

Fixation:

75% Aceton

in PBS

Lösung zur AK-Verdünnung:

5% fettfreies Milchpulver

Valio, Finnland

in PBS

Chromogenlösung:

2mg 3-Amino-9-ethylcarbazol

0,5ml Dimethylformamid

9,5ml Acetatpuffer pH 5,0

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (1µl/ml)

## PROTEINBIOCHEMIE

30% Acrylamid/bis:

29,2% Acrylamid

0,8% N`N`-bis-methylen-Acrylamid

Natriumdeoxylchololat (DOC)

Gurr Ltd.: 12372

Natrium-Dodecylsulfat (SDS)

BDH Laboratory Supplies: 442152V

Laemmli-Puffer:

- 10% Sucrose
- 5% 2-Mercaptoethanol
- 2% SDS
- 0,0652 M Tris-HCl pH 6,8
- 0,0004% Bromphenolblau

Proteinmarker:

- |                                   |   |
|-----------------------------------|---|
| ProSieve color protein markers    | Bio-Whittaker Molecular<br>Applications: BM0150 |
| Kaleidoscope Prestained Standards | Bio-Rad Laboratories: 161-0324                  |

Proteinkonzentration:

- |  |                                |
|--|--------------------------------|
| Bio-Rad Protein Assay Kit II   | Bio-Rad Laboratories: 500-0002 |
| Enthält Farbreaktionskonzentrat und<br>Proteinstandard BSA (Rinderserum<br>albumin, 1 mg/ml in H <sub>2</sub> O) |                                |

SDS-Elektrophoresepuffer:

- 3% Tris
- 14,4% Glycin
- 1% SDS

Tris-Pulver	ICN Biomedicals: 103133
-------------	-------------------------

Western Blot (WB) Blocking Puffer:

- |                           |                 |
|---------------------------|-----------------|
| 5% fettfreies Milchpulver | Valio, Finnland |
| in PBS pH 7,4             |                 |

WB Detection Kit:

ECL <sup>TM</sup> (Enhanced Chemiluminescence)	Amersham Biotech: RPN2106
--	---------------------------

WB Transferpuffer:

3g/l Tris

14,4g/l Glycin

versetzt mit 20% Methanol

Zellyse-Puffer:

150mM NaCl

1% Nonidet P-40

BDH Laboratory Supplies: 56009

0,4% Natriumdeoxychololat (DOC)

0,1% Natrium-Dodecylsulfat (SDS)

50mM Tris-HCl pH 8,0

1mM Phenyl-Methylen-Sulfonyl-Fluorid,  
gelöst in Isopropanol

10µg/ml Leupeptin

10µg/ml Aprotinin

### **2.1.4 Chemikalien**

Lösungsmittel:

Dimethylsulfoxid (DMSO)

Sigma: 60153

Aktin-stabilisator/-destabilisator:

Jasplakinolide

Molecular Probes: J-7473

Latrunculin A

Molecular Probes: L-12370

Tubulin-stabilisator/-destabilisator:

Taxol<sup>TM</sup> (Paclitaxel)

Sigma: T7191

Nocodazol

Sigma: M1404

Mitogen:

Phytohämagglutinin P, Bacto™

Becton Dickinson: 211796

### **2.1.5 Verbrauchsmaterial**

3MM-Whatmanpapier

Bio-Rad

Einmalpipetten

Costar

Epis

Sarstedt

Handschuhe

Oriola

Mikrotiterplatten:

Microstrip 8-Well-Platten

Labsystems

Nitrozellulosemembran:

PVDF-Membran, Hybond-P

Amersham Biotech

Pipettenspitzen

Finnpipett

Plastikartikel für Zellkultur

Costar, Falcon, Finnzymes

Röntgenfilme:

CP-BU new, 100 NIF

AGFA

Sterling Cronex, medical X-ray film 4

Sterling Diagnostic Imaging

Fotofilme: 24 oder 36 Bilder, Farbe

AGFA, Kodak

Zentrifugenröhrchen

Sarstedt

### **2.1.6 Geräte**

Analysewaagen:

AE100 und PC4400

Mettler

Brutschränke

Forma Scientific

Gefrierschrank:

Revco: ULT 1786 V-O-D

Halbtrockenblottingapparatur:

Hoefler Semi-Dry Transfer Unit

Amersham Biotech

Mikroskope	Leitz
Mikroskop mit Fotoapparat	Leitz
Röntgenfilmentwicklerautomat:	
Curix 60	AGFA
SDS-Gelelektrophoresekammern:	
Für kleine Gele:	
Hoefler Mighty Small II, SE 250	Amersham Biotech
Für große Gele:	Institutswerkstatt
Spectrophotometer:	
Multiscan PLUS	Labsystems
Sterilbank	Kojair
Tischzentrifuge:	
Biofuge A	Heraeus
Vortexer	Heidolph
Zentrifuge:	
TechnoSpin R	Sorvall Instruments

## **2.2 Methoden**

### **2.2.1 Zellkultur**

#### VERO-ZELLEN

Vero-Zellen wachsen adhärent und werden in 12-well-plates als Monolayer mit einer Zelldichte von  $1 \times 10^6$  Zellen gezüchtet. Dem Zellkulturmedium BME (Basal Medium Eagle) werden 0,2% Rinderserumalbumin (BSA), 5% TPB (tryptose phosphate broth) und  $10 \mu\text{g/ml}$  Gentamycin zugesetzt. Die Kultur erfolgt im Brutschrank bei  $37^\circ\text{C}$  und unter 5%iger  $\text{CO}_2$ -Begasung.

#### PBMC

Als Medium für die PBMC-Zellen dient RPMI 1640 mit 10% fetalem Kälberserum (FCS) und  $10 \mu\text{g/ml}$  Gentamycin. Im Brutschrank werden sie in Plastik-Gewebekulturflaschen verschiedener Größen bei  $37^\circ\text{C}$  und 5%  $\text{CO}_2$ -Begasung gezüchtet. Dabei beträgt die Zellzahl  $1 \times 10^6/\text{ml}$  Medium.

### **2.2.2 Isolierung primärer mononukleärer Zellen aus humanem Blut**

Die Isolation der PBMC erfolgte aus sogenannten Buffy Coats, die aus dem heparinisierten venösen Blut gesunder Spender des Finnischen Roten Kreuzes in Turku hergestellt wurden. Die Buffy Coats wurden 1:1 mit PBS verdünnt, auf ein Kissen Ficoll-Paque™ Plus geschichtet und bei Raumtemperatur durch Zentrifugation 45 min bei 1.500 rpm entsprechend der Dichte aufgetrennt. Auf diese Weise erhält man eine PBMC-haltige Phase auf dem Ficoll-Paque-Kissen, während die übrigen Blutzellen sich darunter befinden. Mit einer Pasteurpipette wurde die PBMC-Phase abgenommen und zweimal mit PBS gewaschen (jeweils 10min bei 1.200 rpm). Entsprechend der weiteren Verwendung wurden die Zellen gezählt und im Medium resuspendiert.

### **2.2.3 Infektion**

Vero-Zellen wurden mit 0,1 MOI (außer beim Immunperoxidase-Färbung, s. dort) und PBMC mit 5,0 MOI infiziert und 1h inkubiert. Dann wurde das ungebundene Virus durch Waschen mit PBS entfernt (10min bei 1.200rpm) und die Zellen in frischem Medium resuspendiert.

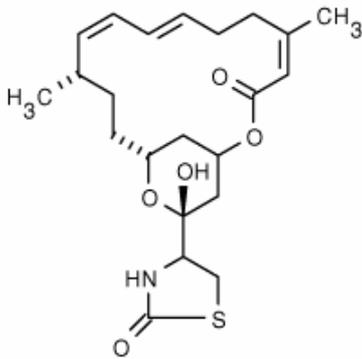
Je nach Probe wurden die entsprechenden Konzentrationen der unter 2.2.4 beschriebenen Chemikalien hinzugefügt.

### **2.2.4 Chemische Behandlung und Beeinflussung der Zelle**

#### BEEINFLUSSUNG DER AKTINSTRUKTUR

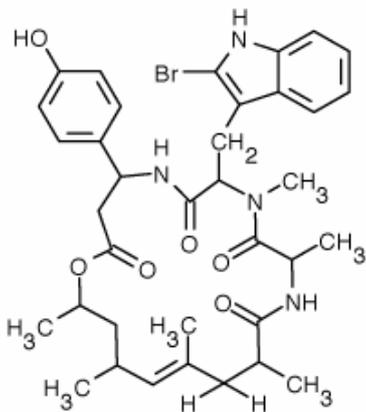
Das Aktinskelett wurde mit Hilfe von Jasplakinolid (Jaspla) und Latrunculin A (Lat-A) moduliert. Dabei wirkt Jaspla erwiesenermaßen polymerisierend, während Lat-A die Aktinfilamente zerstört.

**Latrunculin A** ( $C_{22}H_{31}NO_5S$ ) wird aus Schwämmen des Roten Meers (*Latrunculia magnifica*) gewonnen. Im Unterschied zu den Cytochalasinen, die in den bisherigen Untersuchungen zur Aktin-Virus-Wechselwirkung benutzt wurden, bildet Lat-A 1:1-Komplexe mit G-Aktin, die monomere Form des Aktins, so dass weniger freie Monomere zur Verfügung stehen. Damit hemmt es nur die Polymerisation von F-Aktin, während die Cytochalasine kompetitiv zu endogenen Regulatoren das gesamte Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau beeinflussen (Ayscough 1998). Die Wirkung der Chemikalie ist reversibel und führt nicht zum Zelltod.



**Abbildung 11: Strukturformel von Latrunculin A.**

**Jasplakinolid** ( $C_{36}H_{45}BrN_4O_6$ ) ist ein Makromolekül, das natürlicherweise in dem marinen Schwamm *Jaspis johnstoni* vorkommt. Es senkt die kritische Konzentration an G-Aktin, welche die Lage des Gleichgewichts zwischen Auf- und Abbau bestimmt, und induziert die Nukleation (Bubb *et al.* 2000). Damit stimuliert Jaspla die Aktinpolymerisation *in vitro* und kann, weil es die Zytoplasmamembran passiert, auch zur Behandlung lebender Zellen verwendet werden.



**Abbildung 12: Strukturformel von Jasplakinolid.**

## BEEINFLUSSUNG DER MIKROBULUSSTRUKTUR

Zur Depolymerisation von Tubulin wurde Nocodazol (Noc) verwendet, wohingegen Paclitaxel oder auch Taxol (Tax) die Mikrotubuli stabilisiert.

**Nocodazol** ( $C_{14}H_{11}N_3O_3S$ ) bindet direkt an  $\beta$ -Tubulin und verhindert so die Dimerisierung. Zudem wird die GTPase-Aktivität des Tubulins stimuliert (Mejillano *et al.* 1996), was die Depolymerisation des Mikrotubulus fördert und die Konzentration an GDP-gebundenem monomeren Tubulin erhöht (Vasquez *et al.*, 1997). Da auch die Funktion der Mitosespindel beeinträchtigt ist, wird die Zelle in der G2/M-Phase des Zellzyklus arretiert und eine Zellteilung unmöglich.

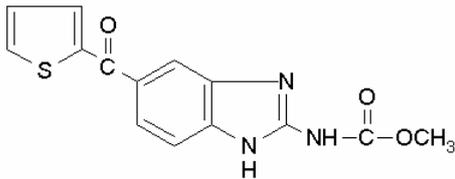


Abbildung 13: Strukturformel von Nocodazol.

**Taxol** ( $C_{47}H_{51}NO_{14}$ ) ist ein natürlicher Bestandteil der Eibe (*Taxus subspecies*) und bindet ebenfalls an  $\beta$ -Tubulin, allerdings an anderer Stelle als Nocodazol. Dadurch entsteht ein extrem stabiler Mikrotubulus, der nicht mehr depolymerisieren kann. Die dynamische Instabilität, die Grundlage der Mikrotubulusfunktionen ist, wird gehemmt. Die Zelle verharrt auch hier in der G2/M-Phase und teilt sich nicht mehr.

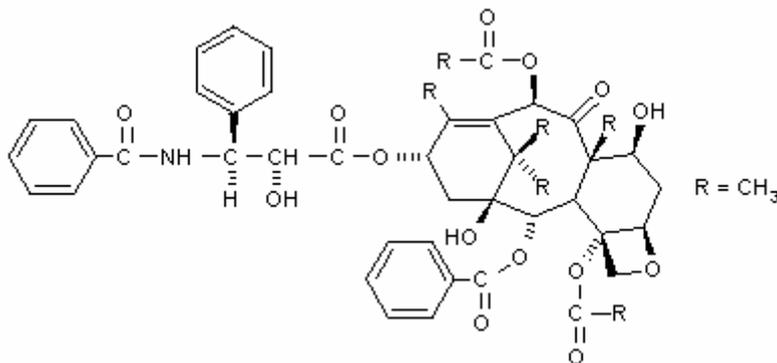


Abbildung 14: Strukturformel von Taxol.

Abhängig von der Dosierung kann eine Behandlung sowohl mit Nocodazol als auch mit Taxol zur Apoptose der Zelle führen. Durch Titration beider Chemikalien auf Vero-Zellen habe ich die Konzentrationen ermittelt, bei denen eine ausreichende Wirksamkeit ohne Zelltod möglich ist.

## STIMULATION DER PBMC

Zur Stimulation der PBMC-Zellen wurde das mitogene Phytohämagglutinin PHA-P eingesetzt. Wie alle Mitogene aktiviert es die Lymphozyten auf unspezifischem Wege, im Gegensatz zu spezifischen Aktivierungsmechanismus der Antigene. Einer der Wege ist interessanterweise die durch PHA verursachte Aktinpolymerisation in den Lymphozyten (Rao 1984).

Phytohämagglutinine sind Lektine, die aus der roten Kidneybohne *Phaseolus vulgaris* gewonnen werden, und setzen sich aus den Komponenten PHA-L und PHA-E zusammen. Während PHA-E vor allem Erythrozyten agglutiniert, ist PHA-L ein Leukozytenagglutinator und das potentere Mitogen.

PHA-P ist die Proteinform von Phytohämagglutinin, PHA-M dagegen das Mukoprotein. Beide stimulieren vor allem die T-Zellen.

Die Stimulationsrate hängt unter anderem ab von der Art des verwendeten Mitogens, seiner Dosis, sowie der Inkubationszeit und der Zelldichte.

## KONZENTRATIONEN UND VERFAHRENSWEISE

Die Chemikalien werden den Herstellerangaben gemäß in Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und bei -20°C gelagert.

Für die Versuche werden sie in folgenden Konzentrationen dem jeweiligen Kulturmedium der zu behandelnden Zellen zugesetzt:

- Latrunculin A: in einer Konzentration von 1,0 $\mu$ M
- Jasplakinolid: 0,05  $\mu$ M
- Nocodazol: 20,0 $\mu$ M und 5,0 $\mu$ M
- Taxol: 20,0 $\mu$ M und 5,0 $\mu$ M

Das Mitogen PHA-P wurde den PBMC-Kulturen in einer Konzentration von 25 $\mu$ g/ml RPMI beigefügt.

Die Behandlung der Zellen erfolgt in unterschiedlicher Weise:

Ein Teil wird wie in 2.2.3 beschrieben zuerst mit MV infiziert. 1h p.i. wird das virushaltige Medium entfernt, und die Zellen werden mit PBS gewaschen. Das frische Medium enthält nun die verschiedenen Konzentrationen der Chemikalien. Die Zellen verbleiben bis zum Zeitpunkt der Probengewinnung weiter bei 37°C in den Brutschränken.

Der andere Teil wird bereits vor Infektion mit chemikalienhaltigem Medium behandelt. Nach 1h bzw. 2h werden auch sie infiziert und eine weitere Stunde inkubiert. Nach Entfernen des Mediums werden die Zellen mit PBS gewaschen und erhalten frisches Medium. Dieses enthält wieder die zuvor verwendeten Substanzen in gleicher Konzentration.

Durch die Zugabe der Chemikalien zu unterschiedlichen Zeitpunkten soll untersucht werden, ob eine vorherige Behandlung mit das Ausmaß der MV-Infektion beeinflusst, und ob die Wirkung vor oder nach Infektion variiert.

### **2.2.5 Gewinnung des Probenmaterials**

Nach Infektion und Inkubation wurden die Zellen 10min bei 1.200rpm zentrifugiert.

0,5ml des Überstands wurden entnommen und für die Plaquetitration bei -70°C eingefroren. Der Rest wurde verworfen.

Nach zweimaligem Waschen mit PBS (je 5min bei 5.000rpm) wurde das Zellpellet bei -70°C bis zu seiner weiteren Verwendung eingefroren.

Das Auftauen sowohl von Überstand als auch von Pellet erfolgte bei 4°C.

### **2.2.6 Plaquetitration**

Der Plaquetest ist eine präzise Methode, um die Menge an infektiösen Viruspartikeln in einer Viruspräparation zu bestimmen. Plaques sind Infektionsfoci, die durch einen zytopathischen Effekt (CPE) in einem konfluenten Zellrasen entstehen. Jeder Plaque stammt von einem einzigen infektiösen Virus ab, so dass die Anzahl der Plaques den Virustiter genau widerspiegeln.

Zur Bestimmung der MV-Titer werden aus den virushaltigen Überständen der gesammelten infizierten Zellen Verdünnungsreihen in Zehnerschritten hergestellt. Diese werden auf einen fast konfluenten Vero-Zellrasen in einer 6-Well-Plates (mit ca.  $1 \times 10^6$  Zellen/Napf) gegeben und für 60 Min. bei 37°C inkubiert.

Die anschließend zugegebene CMC-Lösung bindet bis dahin nicht adsorbiertes Virus und verhindert so eine nachträgliche Infektion. Bis zum Auftreten deutlicher Plaques (7-8 Tage p.i.) werden die Zellen bei 37°C und 5% CO<sub>2</sub> inkubiert.

Zur besseren Darstellung der Plaques werden die Zellen gefärbt. Dazu wird das Medium aus den Näpfen entfernt und Kristallviolett-Lösung zugefügt, das nur vitale Zellen anfärbt. Nach einer Inkubationszeit von 1-3h wird die Farblösung abgewaschen und die farblosen Plaques können auf der Lichtplatte ausgezählt werden.

Der Titer wird anhand der Standard-Plaque-Zählung nach Vainionpaa *et al.* 1978 bestimmt und in PFU (Plaque Forming Units) wiedergegeben.

### **2.2.7 Immunperoxidase-Färbung**

Die verwendete Methode der Immunperoxidase-Färbung (IPS) wurde 1990 von Waris *et al.* beschrieben und basiert darauf, dass die an den Sekundär-AK gekoppelte Peroxidase mit dem Chromogen reagiert und eine Rotfärbung bewirkt. Auf diese Weise können infizierte Zellen spezifisch angefärbt und lichtmikroskopisch sichtbar gemacht werden.

Hierfür werden Vero-Zellen als Monolayer ( $1 \times 10^6$  Zellen/well) auf 12-well-plates herangezogen und mit 0,001 MOI infiziert. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C im Brutschrank mit 5% CO<sub>2</sub> wird überschüssiges MV mit PBS abgewaschen. Die Behandlung mit den Chemikalien erfolgt analog zu 2.2.4.

Nach gewünschter Inkubationszeit der Zellen mit Chemikalien und MV wird 0,5ml des virushaltigen Mediums zur Plaquetitration entnommen und bei -70° eingefroren. Das restliche Medium wird entfernt.

Die Zellen werden 15min in 75% Aceton in PBS bei 4°C fixiert und anschließend zweimal mit PBS-T gewaschen. Bis zur Immunfärbung werden die Zellen zum Schutz vor Austrocknung mit PBS bedeckt und bei 4°C gelagert.

Für die Immunfärbung werden die fixierten Zellen mit dem primären Kaninchen-Anti-Masern-AK MVR4-ad in einer Konzentration von 1:1.000 (in 5% Milch in PBS) 1h bei 37°C inkubiert, dann zweimal mit PBS-T und zuletzt einmal mit PBS gewaschen.

Der Sekundär-AK ist mit Peroxidase konjugiert und wird 1:200 in 5%iger Milch verdünnt. Auch hier erfolgte die Inkubation 1h bei 37°C. Anschließend werden die platten mit PBS-T (zweimal) und PBS (einmal) gewaschen.

Ca. 30min nach Zugabe von 300µl Chromogenlösung pro Napf färben sich die infizierten Zellen rot.

Die Reaktion wird gestoppt, indem das Chromogen mit Wasser abgewaschen wird. Um eine Austrocknung zu verhindern, werden die Zellen mit PBS bedeckt.

Unter dem Mikroskop können die infizierten Zellen leicht identifiziert und ausgezählt werden. Die Fotografien wurden mit 4-, 10- und 20-facher Vergrößerung unter dem Mikroskop aufgenommen.

### **2.2.8 SDS-PAGE und Western Blot**

Mit der SDS-Polyamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) wird das Gemisch der Proteine des Probenmaterials nach Molekulargewicht in seine Fraktionen aufgetrennt. Anschließend ermöglicht der Western Blot (WB) die Analyse der einzelnen Fraktionen und den Nachweis MV-spezifischer Proteine.

#### HERSTELLUNG VON ZELLYSATEN

Zellysate werden hergestellt, um die Proteine aus den Zellen zu lösen und so für eine SDS-Gelelektrophorese mit anschließender Western-Blot-Analyse zu gewinnen. Das aufgetaute Zellpellet wird in 100µl des Zellysepuffers aufgelöst. Nach einer 30minütigen Inkubation bei 4°C werden die übrigen Zellbestandteile bei 13.000rpm für 20min (4°C) abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und die Proteinkonzentration bestimmt.

#### BESTIMMUNG VON PROTEINKONZENTRATIONEN

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wird das Bio-Rad Protein-Assay-Kit II benutzt, das auf der Bradford-Methode basiert (Bradford 1976).

Diese Methode basiert auf dem Prinzip, dass eine saure Lösung des Farbstoffs Coomassie Blue G-250 an die freien Aminogruppen der Proteine bindet. Die maximale Adsorption für Coomassie Blue liegt bei 595nm und ist direkt proportional zur Proteinkonzentration.

In die Näpfe einer Mikrotiterplatte werden 2µl der zu bestimmenden Proteinlösung mit 200µl einer 1:5 Verdünnung des Coomassie Blue enthaltenden Bio-Rad Farbreagens in Wasser versetzt.

Im Multiscan-Spectrophotometer wird die Adsorption bei 595nm gemessen und der Proteingehalt der Probe mit Hilfe von Standardproteinlösungen bekannten Proteingehalts berechnet.

## SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wird nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt.

Durch das denaturierende Agens SDS verlieren die Proteine ihre Quartär- und Tertiärstruktur und entfalten sich in einer linearisierten Form. Die negativ geladenen SDS-Moleküle umhüllen die Proteine zylindrisch und überdecken die elektrischen Ladungen der Proteine. Auf diese Weise spielen die Eigenladungen der Proteine bei der elektrophoretischen Auftrennung keine Rolle mehr, weil nun alle Moleküle zum Pluspol hin laufen. Da die negative Ladung durch SDS der Proteingröße entspricht, können die Proteine in einem elektrischen Feld nach Molekulargewicht aufgetrennt werden.

Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems erlaubt die Aufkonzentration verschiedener Proben an der Grenze zwischen dem so genannten Sammelgel und dem folgenden Trenngel. Das im Sammelgel und im Probenpuffer enthaltene Glycin liegt aufgrund des pH-Wertes im Sammelgel als Zwitterion vor. Somit werden die Proteine zwischen den so genannten Leitonen (= Chloridionen) und den Folgeionen (= Glycinionen) gefangen und unter dem Einfluss des elektrischen Feldes fokussiert. Zwischen Sammel- und Trenngel kommt es zu einem pH-Sprung von pH 6,8 auf pH 8,7. Das Glycin liegt dann als Anion vor und wandert als kleines Molekül zusammen mit den Chloridionen den größeren Proteinanionen voraus. Damit sind die Proteinanionen nicht mehr zwischen den ehemaligen Leit- und Folgeionen gefangen. Deshalb werden sie im Trenngel unter Einfluss des angelegten elektrischen Feldes allein ihrer Größe gemäß aufgetrennt.

Die Proteine aus den Zelllysaten werden in einem Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt.

In der verwendeten Mighty-Small-Apparatur laufen stets zwei kleine Gele parallel, daher sind die Mengenangaben für die Herstellung zweier Gele gedacht. In der großen Apparatur laufen ebenfalls 2 Gele, die Mengenangaben für die beiden großen Gele steht in Klammern.

Das 12%ige Trenngel setzt sich wie folgt zusammen:

4,0ml (24ml) 30%iges Acrylamid/bis

2,5ml (15ml) 1,5M Tris-HCl, pH 8,8

3,35ml (20,1ml) destilliertes Wasser

100 $\mu$ l (600 $\mu$ l) 10% SDS

50 $\mu$ l (300 $\mu$ l) 10% APS

6 $\mu$ l (36 $\mu$ l) TEMED

Die Trenngel-Lösung wird blasenfrei zwischen die Glasplatten der Apparatur eingefüllt und vorsichtig mit destilliertem Wasser überschichtet.

Nach Polymerisation des Gels wird das Wasser entfernt und das Sammelgel auf das Trenngel gegossen.

Das 4%ige Sammelgel wird hergestellt aus:

650 $\mu$ l (2,5ml) 30%iges Acrylamid/bis

1,25ml (5,0ml) 0,5M Tris-HCl, pH 6,8

3,05ml (12,2ml) destilliertes Wasser

50 $\mu$ l (200 $\mu$ l) 10% SDS

25 $\mu$ l (120 $\mu$ l) 10% APS

5 $\mu$ l (20 $\mu$ l) TEMED

In das noch flüssige Sammelgel wird ein Kamm eingeschoben, der nach Polymerisation, Einsetzen der Gelapparatur in die Elektrophoresekammer und Einfüllen des Proteingelpuffers wieder entfernt wird. Auf diese Weise entstehen Taschen, die vor dem Einfüllen der Proteinproben mit Puffer ausgespült werden.

Die Proben werden mit reduzierendem Laemmli-Probenpuffer versetzt und 5min bei 95°C denaturiert. Der Marker wird ohne Laemmli-Puffer 1min bei 40°C erhitzt und läuft als Referenzprotein in der PAGE mit.

Pro Tasche und Spur wird die gleiche Proteinmenge aufgetragen.

Die Laufzeit beträgt im Schnitt 1h 30min bei 175V für kleine Gele sowie 18-19h bei 15mA für große. Die PAGE läuft so lange, bis die Markerbanden für die kleineren Proteine (<19 kDa) das Sammelgel verlassen haben. Dies ermöglicht eine bessere Auftrennung der größeren Proteine, zu denen die MV-Proteine zählen.

Im Anschluss an die Elektrophorese werden die Gele für die Western-Blot-Analyse weiterverwendet.

## WESTERN-BLOT-ANALYSE

Der Western-Blot nach Towbin *et al.* (1979) erlaubt den Nachweis einzelner Proteine aus einem Proteingemisch. Zu diesem Zweck werden die mittels SDS-PAGE aufgetrennten Proteine auf eine Nitrozellulosemembran übertragen, wobei Proteinmuster und Immunaktivität der Proteine erhalten bleiben.

Aus diesem Grunde bezeichnet man das Verfahren auch als Immunoblotting. Übertragen werden die Proteine mit einer speziellen Blottingapparatur im halbtrockenen Verfahren, indem zwischen Anode und Kathode der Apparatur ein Stromfluss angelegt wird.

Die Transfereinheit ist folgendermaßen aufgebaut:

- Kathode (oben)
- *drei Whatman-Papiere, getränkt mit Transferpuffer*
- *Polacrylamidgel, befeuchtet mit Transferpuffer*
- *Nitrocellulosemembran, äquilibriert: 10s in Methanol, 5min in H<sub>2</sub>O, 10min in Transferpuffer*
- *drei Whatman-Papiere, getränkt mit Transferpuffer*
- Anode (unten)

Beim Aufbau der Blotting-Einheit ist darauf zu achten, dass alle Schichten blasenfrei aufeinander liegen. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgt bei einer Stromstärke von  $0,8\text{mA}/\text{cm}^2$  und dauert 1h 30min.

Danach werden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran mit Blockingpuffer bei 4°C ü/N blockiert.

Alle weiteren Inkubations- und Waschschrirte erfolgen auf einem Wippschüttler. Der immunologische Nachweis der MV-Proteine auf der Nitrozellulosemembran erfolgt mittels des Antikörpers MVR4-ad, der in Blockingpuffer 1:1.000 verdünnt wird. Nach einstündiger Inkubation bei 37°C wird die Membran dreimal 10min mit PBS-T und einmal mit PBS gewaschen.

Zum Nachweis des Primärantikörpers wird die Membran mit einem Peroxidasegekoppelten Zweitantikörper, der 1:200 in Blockingpuffer verdünnt wurde, 1h bei 37°C inkubiert. Anschließend werden ungebundene AK entfernt, indem die Membran dreimal mit PBS-T und einmal mit PBS gewaschen wird.

Die MV-Proteine sind nun mit den beiden Antikörpern markiert und können mit dem ECL™-System von Amersham nachgewiesen werden: Die Meerrettichperoxidase (HRP) des Sekundärantikörpers setzt dabei das in den ECL™-Reagentien enthaltene Substrat Luminol um. Auf diese Weise werden Photonen frei, die an der Stelle der spezifisch markierten Proteinbanden zur Schwärzung des Röntgenfilms führen.

Hierfür wird die Membran nach Inkubation mit beiden AK 1min lang einem 1:1-Gemisch aus beiden ECL™-Reagentien ausgesetzt und nach kurzem Abtropfen in eine haushaltsübliche Plastikgefrierfüte gesteckt.

Die Exposition auf den Röntgenfilm erfolgte mit unterschiedlicher Dauer von 1min bis 30min. Entwickelt wurde der Film in einem Automaten.

## 3 Ergebnisse

---

### 3.1 Untersuchung der Bedeutung des Polymerisationszustandes von Aktin für die Infektion mit MV

#### 3.1.1 Die Bedeutung von F-Aktin für die MV-Freisetzung aus PBMC

Mittels Plaquetitration wurde die Wirkung des aktinstabilisierenden Agens Jasplakinolid auf die Produktion von Masernvirus untersucht.

Wie erwartet konnte keine Freisetzung infektiöser Viruspartikel aus unbehandelten und unstimulierten PBMC festgestellt werden (siehe Tabelle 4). Die minimale Zahl an Virus von 10 PFU/ml stammt wahrscheinlich von inokkuliertem MV.

Eine deutliche Erhöhung der Menge an infektiösen Viren war dagegen im Kulturmedium der mit Jasplakinolid behandelten PBMC erkennbar. Nach Inkubation mit 48h p.i. entnommenem Medium konnten 160 PFU/ml gezählt werden. Ein leichter Rückgang auf 130 PFU/ml nach 72h p.i. ist womöglich auf das Absterben der Zellen durch die Chemikalie zurückführbar.

Die Stimulierung der PBMC mit PHA ließ die Virusproduktion erwartungsgemäß stark ansteigen. 72h lang mit PHA behandelte und MV-infizierte Kulturen zeigten mit 2.400 PFU/ml die größte Virusmenge.

Interessanterweise war eine Hemmung der PHA-induzierten Freisetzung von MV durch Jaspla feststellbar. Die Zahl der Plaques stieg nicht auf ähnlich hohe Werte wie in PHA-stimulierten PBMC an, wenn sowohl Jaspla als auch PHA dem Kulturmedium beigelegt wurde. Statt dessen blieb sie mit 150 PFU/ml nach 48h bzw. 120 PFU/ml nach 72h etwa mit der Zahl der Plaques nur mit Jaspla behandelter PBMC vergleichbar.

**Tabelle 4: Freisetzung infektiöser MV-Partikel in PBMC unter Jasplakinolid und PHA, untersucht anhand von Plaquetitration.**

den PBMC hinzugefügt:	PFU/ml		
	24h p.i.	48h p.i.	72h p.i.
<b>MV</b>	10	10	20
<b>MV, Jaspla</b>	40	160	130
<b>MV, PHA</b>	3	300	2.400
<b>MV, PHA, Jaspla</b>	0	150	120

Die Proben wurden 24h, 48h und 72h nach Infektion der PBMC entnommen, auf Vero-Zellen inkubiert und nach 8 Tagen mit Kristallviolett gefärbt. Die angegebenen Titer sind Mittelwerte aus drei Experimenten.

### ***3.1.2 Erhöhung des G-Aktin-Pools in Vero-Zellen und die Folgen für die MV-Infektion***

Da Vero-Zellen empfänglich für eine MV-Infektion sind und die Freisetzung infektiöser Partikel erlauben, konnte in der Plaquetitration mit 72h p.i. entnommenen Proben aus unbehandelten Vero-Zellen ein hoher Virustiter von 11.000 PFU/ml gemessen werden.

Die Behandlung mit dem aktindestabilisierenden Latrunculin A führte zu weitaus geringeren Zahlen. So waren 48h p.i. erst 10 PFU/ml erkennbar, und selbst 72h p.i. war der Titer mit 280 PFU/ml fast 40-fach niedriger als ohne Lat-A.

Wurden die Zellkulturen bereits 1h vor Infektion in Lat-A-haltigem Medium inkubiert, sank die Anzahl der Plaques noch weiter ab. Mit 5 PFU/ml (48h p.i.) bzw. 120 PFU/ml (72h p.i.) lag der MV-Titer des Mediums bei rund der Hälfte des Titers von nach Infektion behandelten Zellen.

**Tabelle 5: Freisetzung infektiöser MV-Partikel in Vero-Zellen unter Latrunculin A: Plaquetitration.**

den Vero-Zellen hinzugefügt:	PFU/ml		
	24h p.i.	48h p.i.	72h p.i.
<b>MV</b>	0	160	11.000
<b>MV, Lat-A</b>	0	10	280
<b>Lat-A, MV, Lat-A</b>	0	5	120

Die Proben wurden 24h, 48h und 72h nach Infektion der Vero-Zellen entnommen, auf neuen Vero-Zellen inkubiert und nach 8 Tagen mit Kristallviolett gefärbt. Die angegebenen Titer sind Mittelwerte aus drei Experimenten.

Zur Differenzierung der Lat-A-Wirkung waren die Ergebnisse der IP-Färbung aufschlussreich.

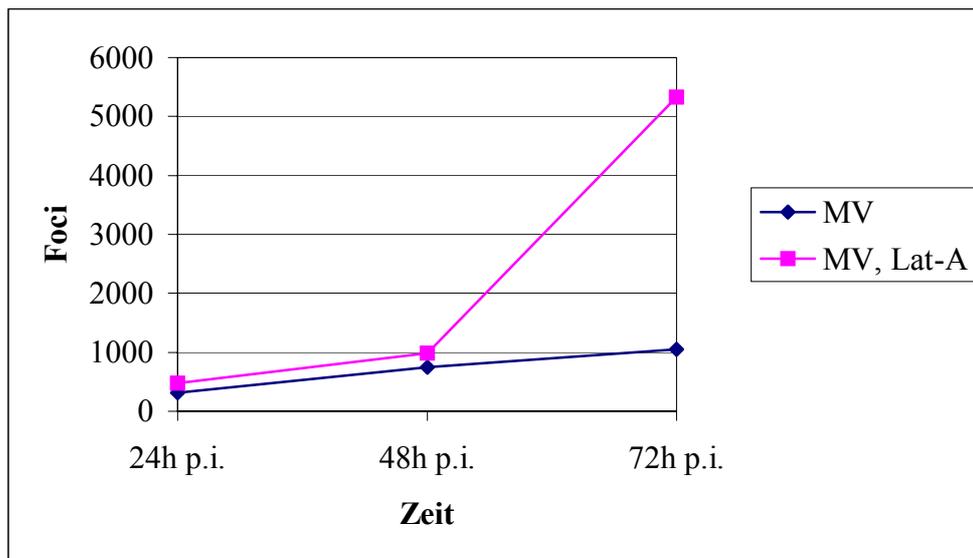
Hierfür wurden unbehandelte und mit Lat-A behandelte Vero-Zellen mit MV infiziert und 24h, 48h sowie 72h p.i. angefärbt.

Die Anzahl MV-positiver Zellen war in beiden Kulturen 24h p.i. ungefähr gleich (Abbildung 15). Wahrscheinlich repräsentieren diese Zahlen die Infektion mit dem inokkulierten MV und noch nicht mit neu produziertem.

Auch nach 48h war noch kein nennenswerter Unterschied zwischen den unbehandelten Vero-Zellen und denen mit Lat-A-Behandlung ersichtlich.

72h p.i. hatte sich die Zahl der Foci in den unbehandelten Zellen jedoch um mehr als verzehnfacht (von 480 Foci auf 5.330 Foci), während Lat-A den Anstieg bremste: Waren 24h p.i. 310 Foci zu zählen, so konnte 72h p.i. mit 1.050 Foci nur eine Verdreifachung festgestellt werden.

Diese Ergebnisse decken sich mit denen der Plaquetitration.



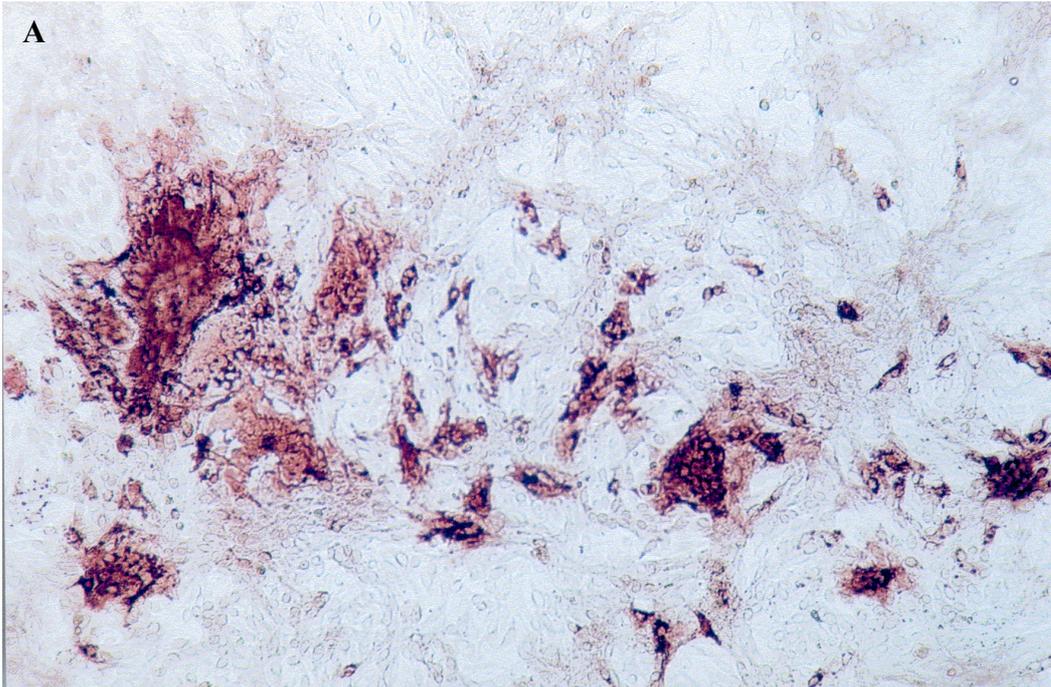
**Abbildung 15: Anzahl der Foci in IP-gefärbten, MV-infizierten Vero-Zellkulturen.**

Die Zellen wurden entweder ohne Chemikalienzusatz infiziert oder 1h p.i. mit 0,5  $\mu\text{M}$  Lat-A behandelt, und in 24h-Intervallen fixiert.

Betrachtet man die infizierten Vero-Zellen nach der IP-Färbung unter dem Mikroskop, so kann man zusätzlich zu den Unterschieden in der Anzahl der Foci auch Unterschiede in ihrer Morphologie erkennen (Abbildung 16).

Unbehandelte Kulturen zeigten 72h p.i. Foci verschiedener Größen nebeneinander (Abbildung 16, Bild A). Die großen Herde bestehen bereits seit längerem und haben durch Freisetzung von Virionen Nachbarzellen neu infiziert. Diese frischeren Herde sind aufgrund ihrer zeitlich kürzeren Existenz noch kleiner.

Im Gegensatz dazu fanden sich in mit Lat-A behandelten Vero-Zellkulturen nach der gleichen Inkubationszeit nur vergleichbar große, multinukleäre Riesenzellen (Abbildung 16, Bild B). Hier hat das Masernvirus sich nur durch die Fusion benachbarter Zellen ausbreiten können. Die Virusfreisetzung wurde durch Lat-A offensichtlich gehemmt.



**Abbildung 16: IP-Färbung MV-infizierter Vero-Zellen 72h p.i.**

Die Kulturen wurden mit Aceton fixiert. MV-positive Herde erscheinen dunkelrot.

Beide Aufnahmen bei 10-facher Vergrößerung.

Bild **A** zeigt eine unbehandelte, mit 0,001 MOI infizierte Zellkultur. Das Masernvirus hat sich offensichtlich repliziert und neue Zellen infiziert (größere Foci: ältere Infektion, kleine Foci: Neuinfektion).

Die Vero-Zellen in Bild **B** wurden mit Latrunculin A behandelt. Die solitäre Riesenzelle weist auf eine verminderte Ausbreitung durch Virionen hin.

## **3.2 Veränderung des mikrotubulären Polymerisationszustandes und ihr Einfluss auf die MV-Infektion**

### ***3.2.1 Auswirkung einer Destabilisierung von Mikrotubuli in Vero-Zellen auf die Replikation von MV***

Die Proteinmenge in MV-infizierten Vero-Zellen 72h p.i wurde im Western Blot untersucht. Hierbei wurde die Mikrotubulus-destabilisierende Substanz Nocodazol (Noc) in drei unterschiedlichen Konzentrationen dem Kulturmedium zugefügt, um eine Dosisabhängigkeit der Wirkung zu überprüfen (Abbildung 17).

Die unbehandelte Zellkultur zeigte deutlich das Vorhandensein viraler Proteine.

Im Vergleich dazu fällt auf, dass in den mit Nocodazol behandelten Zellen die Menge an MV-Protein nur leicht bis gar nicht geringer ist. Im Vergleich mit den Ergebnissen der Plaquetitration (Tabelle 6) wird jedoch klar, dass die produzierte Proteinmenge in den Proben mit Noc geringer sein muss als in der ohne Chemikalienzusatz:

Unter der Wirkung von 20 $\mu$ M Noc konnte nur etwa ein Zehntel der Plaques gezählt werden wie in der unbehandelten Zellkultur.

Auch in eine Konzentration von 10 $\mu$ M verminderte Nocodazol deutlich die Virusfreisetzung: mit 1.500 PFU/ml entstanden nur wenige Plaques mehr als in der Probe mit 20 $\mu$ M Noc.

Dagegen konnten 5 $\mu$ M Nocodazol die Freisetzung infektiöser Viruspartikel zwar noch hemmen, allerdings waren doppelt so viele Plaques erkennbar wie in der mit 10 $\mu$ M Noc behandelten Vero-Zellkultur.

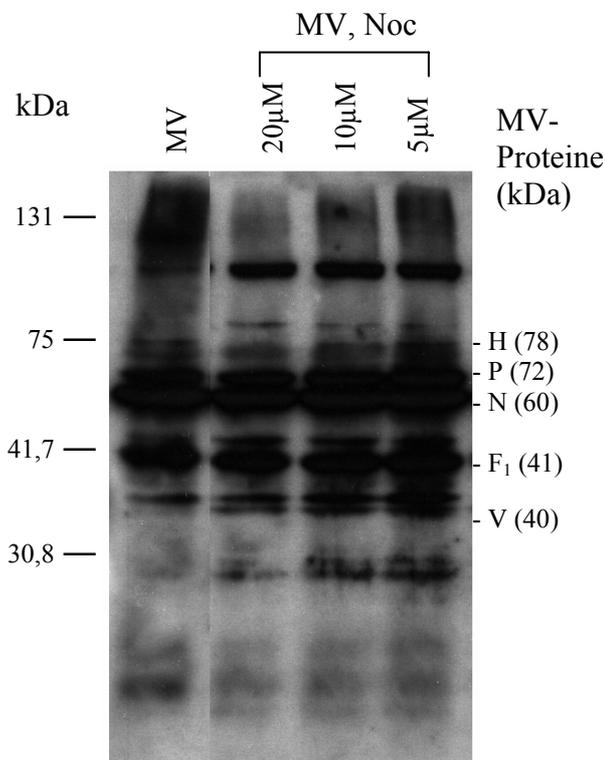
Folglich ist die Menge an in der Zelle enthaltenen MV-Proteinen zwar gleich, die Freilassung unter Noc jedoch stark herabgesetzt. Von den hergestellten Virusbestandteilen konnte also weniger die Zelle verlassen, und dennoch erscheint im WB nicht mehr an Protein. Dies ist mit einer verminderten Proteinsynthese erklärbar.

Demnach kann man feststellen, dass mit steigender Konzentration an Nocodazol und daher mit zunehmender MT-Destabilisation die Synthese viraler Proteine sinkt.

**Tabelle 6: Virusfreisetzung in mit MV infizierten Vero-Zellen unter Nocodazol-Einfluss.**

den Vero-Zellen hinzugefügt:	PFU/ml
MV	10.000
MV, Noc 20µM	1.100
MV, Noc 10µM	1.500
MV, Noc 5µM	3.000

Dem Kulturmedium wurde 1h p.i. Nocodazol in den Konzentrationen 5µM, 10µM und 20µM hinzugefügt. Zum Vergleich wurden unbehandelte Vero-Zellen infiziert. Nach 72h wurden die Proben gesammelt und auf neuen Vero-Zellen inkubiert. 8 Tage später wurden die Monolayer mit Kristallviolett gefärbt.



**Abbildung 17: Western Blot zur Darstellung der MV-Proteine in infizierten und mit Nocodazol behandelten Vero-Zellen.**

Eine infizierte Zellkultur ohne Nocodazol dient als Vergleichsprobe.

Die Vero-Zellen wurden mit 0,1 MOI infiziert und 1h p.i. mit Nocodazol in den Konzentrationen 5µM, 10µM und 20µM behandelt. Nach 72h wurden die Proben gesammelt, mittels SDS-PAGE in ihre Proteinfractionen getrennt und im Western-Blot-Verfahren auf einem Röntgenfilm sichtbar gemacht. Dabei markierte ein polyklonaler Kaninchen-Anti-Masern-AK die MV-Proteinbanden, und die Zugabe des sekundären mit Peroxidase konjugierten Schwein-Anti-Kaninchen-AK ermöglichte die Schwärzung des Röntgenfilms.

### ***3.2.2 Vergleich der Nocodazol-Wirkung in Vero-Zellen vor und nach MV-Infektion***

Zählt man in der IP-Färbung die Foci in Nocodazol-exponierten Vero-Zellkulturen, so lässt sich auch hier eine Hemmung der Virusausbreitung fest stellen (Abbildung 18).

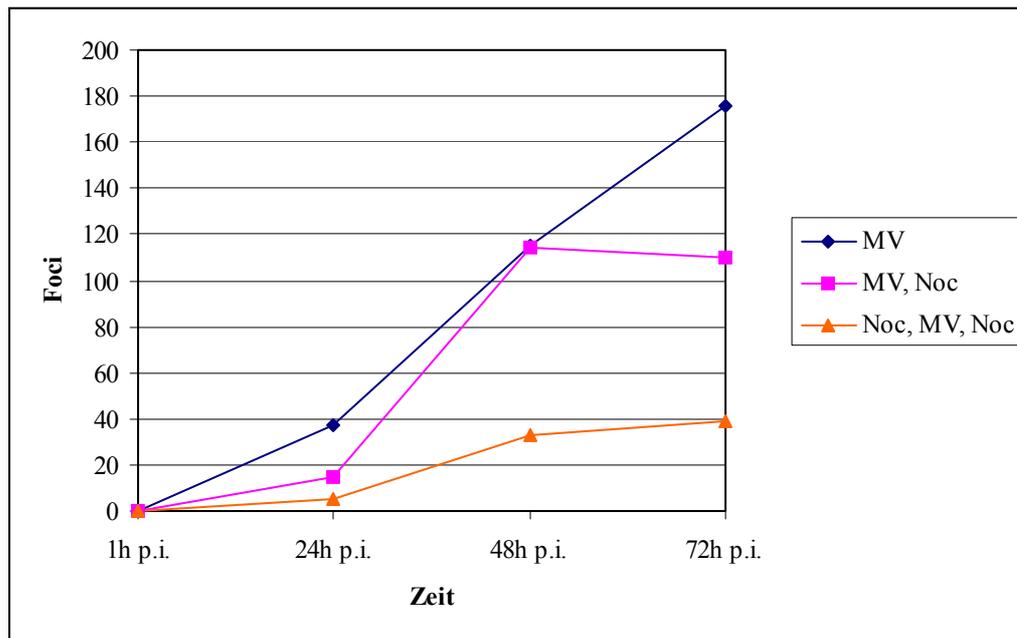
In der MV-infizierten und unbehandelten Kultur stieg die Anzahl der MV-positiven Herde im Verlauf der Zeit ungehindert an.

Betrachtet man im Vergleich dazu Vero-Zellen mit einem Zusatz mit 5µM Noc, so lag die Zahl der Foci 24h p.i. bei der Hälfte. Auch noch 72h p.i. waren weniger Foci zählbar als in der Kultur ohne Chemikalienzusatz. Die Ursache für die Annäherung der Kurven zum Zeitpunkt 48h p.i. ist nicht näher erforscht, kann aber vernachlässigt werden, da es sich um die Werte eines Experiments handelt und nicht um Mittelwerte.

Noch deutlicher tritt der hemmende Effekt von Nocodazol auf die Virusausbreitung zu Tage, wenn man sich die Zellen anschaut, die bereits 1h vor Infektion der Substanz ausgesetzt wurden. 24h p.i. waren nur sehr wenige infizierte Herde feststellbar, und auch 72h p.i. war die Zahl der Foci kaum angestiegen.

In einer direkten Gegenüberstellung der 72h-Werte lässt sich sagen, dass eine Behandlung mit Nocodazol nach Infektion die Anzahl der Foci auf etwa 60% derer in der unbehandelten Probe senkte. Eine einstündige Vorbehandlung der Zellen erreichte sogar eine Reduktion auf 20% des Ausgangswertes.

Demnach scheint die Wirkung von Nocodazol nicht nur von seiner Konzentration abzuhängen, sondern auch und vor allem vom Zeitpunkt seiner Applikation. Anscheinend hemmt Noc die Replikation des Masernvirus bereits an seinem Anfang.



**Abbildung 18: Anzahl der Foci in IP-gefärbten MV-infizierten Vero-Zellen zur Illustration der Nocodazol-Wirkung.**

Die Zellen wurden mit und ohne Chemikalienszusatz infiziert. Der Zusatz von  $5\mu\text{M}$  Noc erfolgte entweder 1h p.i. (MV, Noc) oder bereits 1h vor Infektion (Noc, MV, Noc). Die Zellen wurden in 24h-Intervallen mit Aceton fixiert.

### ***3.2.3 Veränderungen des mikrotubulären Polymerisationszustandes und ihre Wirkung auf die MV-Ausbreitung***

Aufschluss über die Bedeutung des mikrotubulären Polymerisationszustandes für die MV-Infektion gab die lichtmikroskopische Betrachtung der IP-Färbung der unterschiedlich behandelten Vero-Zellkulturen.

Dazu wurden zum einen das destabilisierend wirkende Nocodazol und zum anderen sein Antagonist Taxol in gleicher Konzentration ( $5\mu\text{M}$ ) dem Kulturmedium hinzugefügt. Die Fixation erfolgte in Abständen von 24h, wobei 1h p.i. die erste und 96h p.i. die letzte Serie fixiert wurde.

Eindeutige Veränderungen waren erstmals 48h p.i. erkennbar und sind in Abbildung 19 dargestellt.

In den unbehandelten Vero-Zellen hat das Virus sich ungehindert ausbreiten und, wie die unterschiedliche Größe der Foci beweist, durch Freisetzen infektiöser Partikel neue Zellen infizieren können.

Eben diese Freisetzung wurde durch die Behandlung mit Nocodazol vermindert. Im Mikroskop erscheinen die Foci gleich groß, was auf eine gleichzeitige Infektion der betroffenen Zellen hinweist. Die Ausbreitung des MV erfolgte demnach vor allem mittels Zell-Zell-Fusion, wofür auch die vielen einzelnen Riesenzellen sprachen.

In den mit Taxol behandelten Zellkulturen waren ebenfalls Größenunterschiede zwischen den MV-positiven Herden sichtbar, damit scheint die Virusfreisetzung erwartungsgemäß nicht beeinträchtigt. Allerdings konnte auch kein positiver Effekt des Mikrotubulus-stabilisierenden Agens auf die MV-Ausbreitung festgestellt werden.

Zu diesem Zeitpunkt waren auch die morphologischen Besonderheiten, die beide Chemikalien verursachen, gut erkennbar: Die Herde waren unter Taxol-Wirkung insgesamt größer und runder als in den unbehandelten bzw. mit Nocodazol behandelten Kulturen. Für Nocodazol ist eine helle Aussparung im Zentrum der Foci typisch.

Nach 72h (Abbildung 20) ist die MV-Infektion weiter fortgeschritten.

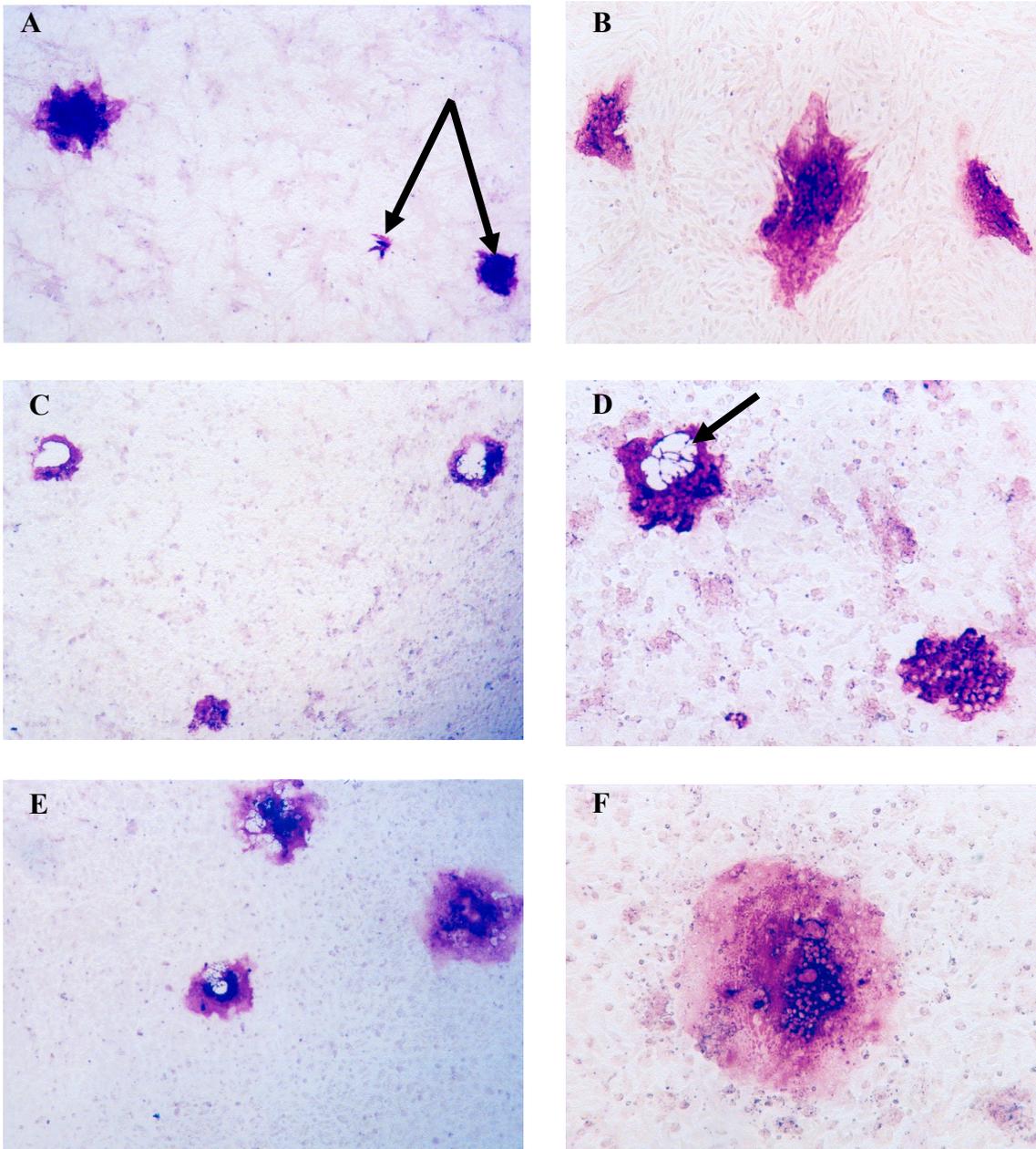
Die Streuung des Virus wurde durch Nocodazol offensichtlich gehemmt, da Zahl und Größe der Foci hinter denen der unbehandelten und der Taxol-exponierten Zellen zurück blieben.

Vero-Zellkulturen unter Wirkung von Taxol zeigten auch zu diesem Zeitpunkt sehr große Herde neben kleineren Tochterherden, wenngleich nicht wesentlich mehr Foci zählbar waren als in der unbehandelten Kultur.

Weitere 24h später, also 96h p.i., hatte das Virus sich so weit ausgebreitet, dass in den unbehandelten Kulturen kaum noch uninfizierte Zellen erkennbar waren (Abbildung 21) und die Auszählung der Foci daher unterlassen wurde.

Auch die Infektion in den mit Nocodazol behandelten Zellen war weiter fortgeschritten, dennoch konnte gegenüber den unbehandelten Zellen eine geringere Zahl und Größe der Foci festgestellt werden.

Taxol bewirkte im Vergleich mit Nocodazol abermals sehr viel größere Herde. Trotzdem schien die Ausbreitung des Masernvirus nicht so weit fortzuschreiten wie in den unbehandelten Kulturen.



**Abbildung 19: Immunperoxidase-Färbung von Vero-Zellen 48h p.i.**

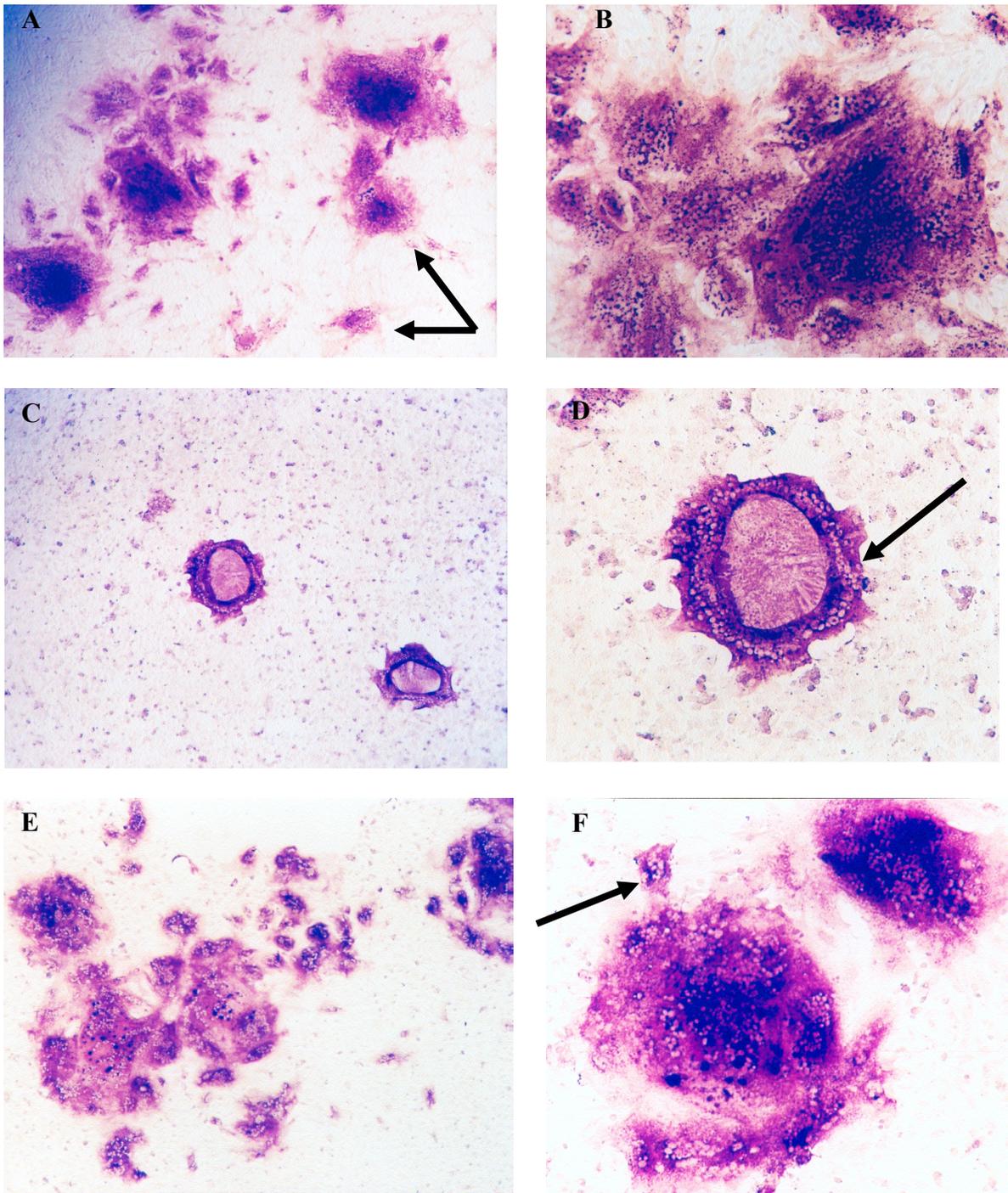
A, C, E wurden mit 4-facher Vergrößerung fotografiert; B, D, F mit 10facher Vergrößerung.

A und B zeigen mit 0,001 MOI infizierte Zellen ohne jegliche Behandlung. Gut sichtbar ist die Ausbreitung der Infektion durch Produktion neuer Viren und Befall weiterer Zellen (Foci unterschiedlicher Größe, siehe Pfeil, A).

Die Zellen auf den Bildern C und D wurden infiziert und 1h p.i. mit Nocodazol (5µM) behandelt. Die Foci sind in etwa gleich groß, was auf eine gleichzeitige Infektion hinweist.

Charakteristisch für die Nocodazol-Wirkung ist die Aussparung inmitten der Foci (s. Pfeil, D).

In Bild E und F wurde dem Medium 1h p.i. Taxol (5µM) hinzugefügt. Erkennbar ist auch hier eine leicht unterschiedliche Größe der Foci; insgesamt sind die Foci größer und runder als bei den unbehandelten bzw. mit Nocodazol behandelten Zellen.



**Abbildung 20: Immunperoxidase-Färbung von Vero-Zellen 72h p.i.**

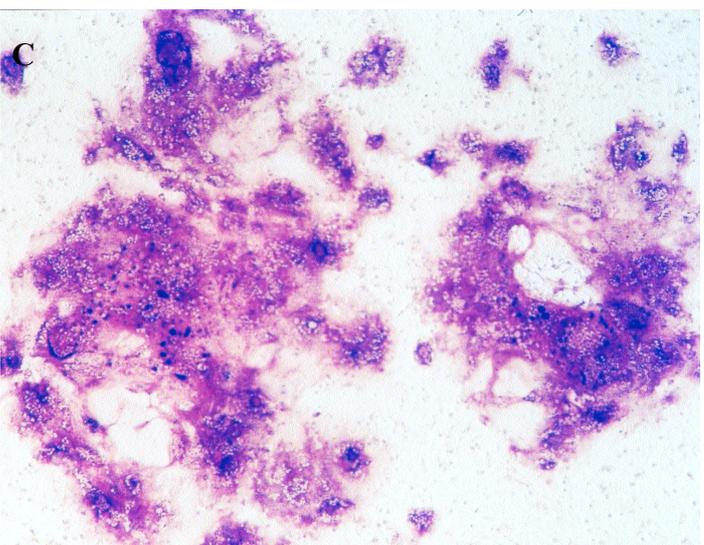
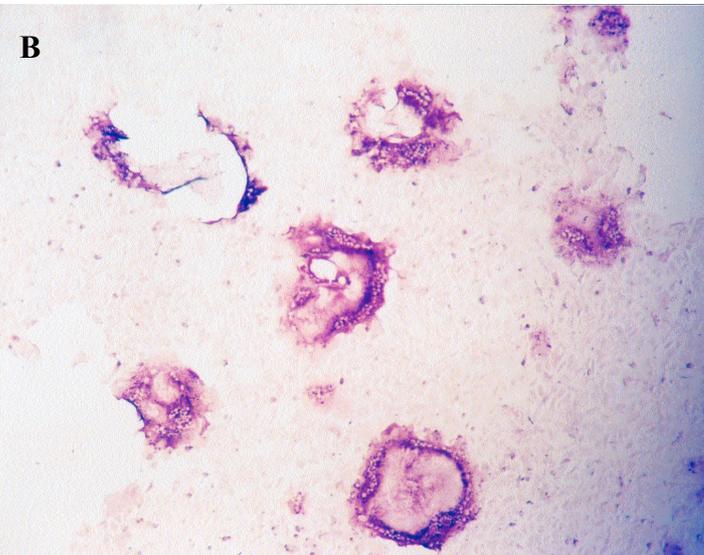
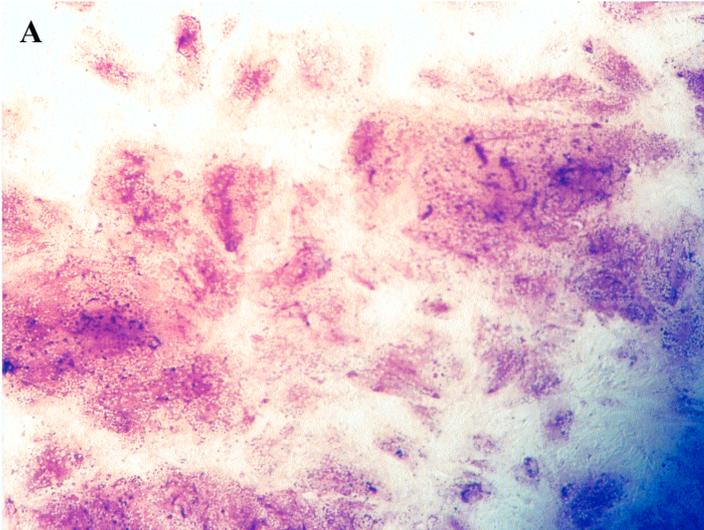
A, C, E mit 4-facher Vergrößerung. B, D, F mit 10-facher Vergrößerung.

Im Vergleich zu Abbildung 17 fällt auf, dass die Ausbreitung des Virus weiter fortgeschritten ist.

Auch nach 72h p.i. ist deutlich zu erkennen, wie die Größe der Foci bei den infizierten unbehandelten Zellen (A, B) variiert (Pfeile, A): je kleiner der Focus ist, desto später erfolgte die Infektion.

Noch ersichtlicher als in Abbildung 17 ist die Hemmung der Ausbreitung durch Nocodazol (C, D). Die helle Aussparung in den Foci der Noc-exponierten Vero-Zellen ist ebenfalls klar zu erkennen (Pfeil, D).

Tax verursacht auch hier rundere und größere Foci (E, F). Die Ausbreitung erfolgt über Neuinfektion: gut erkennbar ist ein kleiner Focus in Bild F (Pfeil).



**Abbildung 21: Immunperoxidase-Färbung von Vero-Zellen 96h p.i.**  
 Alle Aufnahmen mit 4-facher Vergrößerung.  
 Wie Bild A deutlich erkennen lässt, ist nach 96h die virale Ausbreitung sehr weit fortgeschritten. Die Foci in der unbehandelten Zellkultur (A) erreichen überaus große Ausmaße. Auch die Infektion in der mit Noc behandelten Zellen (B) hat sich weiter ausgebreitet, allerdings weniger als in der unbehandelten Vergleichskultur. C zeigt Tax-exponierte Zellen.

Auch in der Auszählung der Foci zeigte Taxol nicht die erwartete Stimulation der MV-Infektion, sondern überraschte mit einer Senkung der Anzahl gegenüber unbehandelten Zellen (Tabelle 7). Bei genauerer Betrachtung erkennt man, dass die Taxol-Behandlung in Bezug auf die Zahl der Foci sehr ähnliche Effekte hatte wie Nocodazol.

So waren 24h p.i. sowohl in mit Tax als auch in mit Noc behandelten Vero-Zellkulturen 15 Foci zählbar. 72h p.i. konnten 100 Foci bei Tax-Exposition und 110 Foci bei Noc-Exposition festgestellt werden.

Auch die Vorbehandlung der Vero-Zellen brachte ähnliche Ergebnisse bei beiden Chemikalien, und zwar eine noch deutlichere verminderte Focizahl gegenüber unbehandelten Kulturen. 24h p.i. fanden sich bei einer Vorbehandlung mit Tax nur 2 Foci, und im Falle von Noc waren es 5. Dem gegenüber stehen 37 Foci ohne Behandlung. Weitere 24h später konnten 29 Foci bei präinfektöser Tax- und 33 Foci bei Noc-Exposition sichtbar, rund 3,9- bzw. 3,5-fach weniger als in unbehandelten Zellkulturen. 72h p.i. ist die Anzahl infizierter Herde mit 38 (MV, Tax) bzw. 39 (MV, Noc) nahezu identisch, und damit um etwa das 4,5-fache gegenüber den Zellen ohne Chemikalienzusatz reduziert.

**Tabelle 7: MV-Ausbreitung in IP-gefärbten, infizierten Vero-Zellen unter Taxol-Einfluss.**

den Vero-Zellen hinzugefügt:	Anzahl der Foci		
	24h p.i.	48h p.i.	72h p.i.
<b>MV</b>	37	115	176
<b>MV, Tax</b>	15	72	100
<b>MV, Noc</b>	15	114	110
<b>Tax, MV, Tax</b>	2	29	38
<b>Noc, MV, Noc</b>	5	33	39

Die Zellen wurden mit und ohne Chemikalienzusatz infiziert. Der Zusatz von 5µM Tax bzw. Noc erfolgte entweder 1h p.i. (MV, Tax/Noc) oder 1h vor Infektion (Tax/Noc, MV, Tax/Noc). Die Zellen wurden in 24h-Intervallen mit Aceton fixiert und die Foci nach der IP-Färbung unter dem Lichtmikroskop ausgezählt.

### **3.2.4 Mikrotubulus-Stabilisation durch Taxol und ihr Effekt auf die Virusfreisetzung aus PBMC**

Die Wirkung von Taxol auf die Freisetzung infektiöser Viruspartikel aus PBMC wurde anhand von Plaquetitration untersucht (Tabelle 8).

Dabei zeigte sich erwartungsgemäß, dass die Infektion unstimulierter PBMC auch nach 72h nicht produktiv war. Die Zahl von 50 PFU/ml stammt wahrscheinlich von inokkuliertem MV.

Wie zuvor in den Vero-Zellen gelang es Tax auch in den mononukleären Zellen nicht, die Virusfreisetzung zu fördern. So lag die Zahl der Plaques etwas unter der in unbehandelten Kulturen. Eine völlige Hemmung der Freisetzung wurde durch Vorbehandlung erreicht, allerdings scheint dieses Ergebnis fraglich.

Die PHA-Zugabe bewirkte eine Aktivierung der PBMC hin zu einer produktiven Infektion, so dass die Freisetzung von neuen Viren aus infizierten Zellen zu der Anzahl von 5.550 PFU/ml führte.

Wurden die PBMC sowohl PHA als auch Tax ausgesetzt, fiel die Stimulation sehr viel geringer aus als in der nur mit PHA behandelten Zellkultur. Anscheinend hemmt Taxol die PHA-induzierte Aktivierung.

**Tabelle 8: Virusfreisetzung in PBMC 72h p.i.: Plaquetitration.**

<b>den PBMC hinzugefügt:</b>	<b>PFU/ml</b>
<b>MV</b>	50
<b>MV, Tax</b>	40
<b>Tax, MV, Tax</b>	0
<b>MV, PHA</b>	5.550
<b>MV, PHA, Tax</b>	230

Die Konzentration an Taxol betrug 5µM. Die Zugabe der Substanzen erfolgte 1h p.i. bzw. 1h vor Infektion (Tax, MV, Tax). Die Proben wurden 72h nach Infektion entnommen, auf Vero-Zellen inkubiert und nach 8 Tagen mit Kristallviolett gefärbt.

### ***3.2.5 Versuch einer Beeinflussung der MV-Proteinmenge in PBMC durch Veränderung des Polymerisationszustandes der Mikrotubuli***

Neben einer Analyse der MV-Freisetzung (Tabelle 8) wurden aus denselben PBMC die Menge an viralen Proteine isoliert und einer näheren Betrachtung unterzogen (Abbildung 20).

Zusätzlich wurden die Proteine aus einer Probe mit reinem Masernvirus im Western Blot sichtbar gemacht. Man kann gut die einzelnen MV-Proteine unterscheiden und mit den synthetisierten Proteinen aus den verschiedenen Zellkulturen vergleichen.

Eine Infektion unstimulierter PBMC zeigte nur wenig virales Protein, das vermutlich nicht von einer aktiven Produktion stammt, sondern von inokuliertem MV.

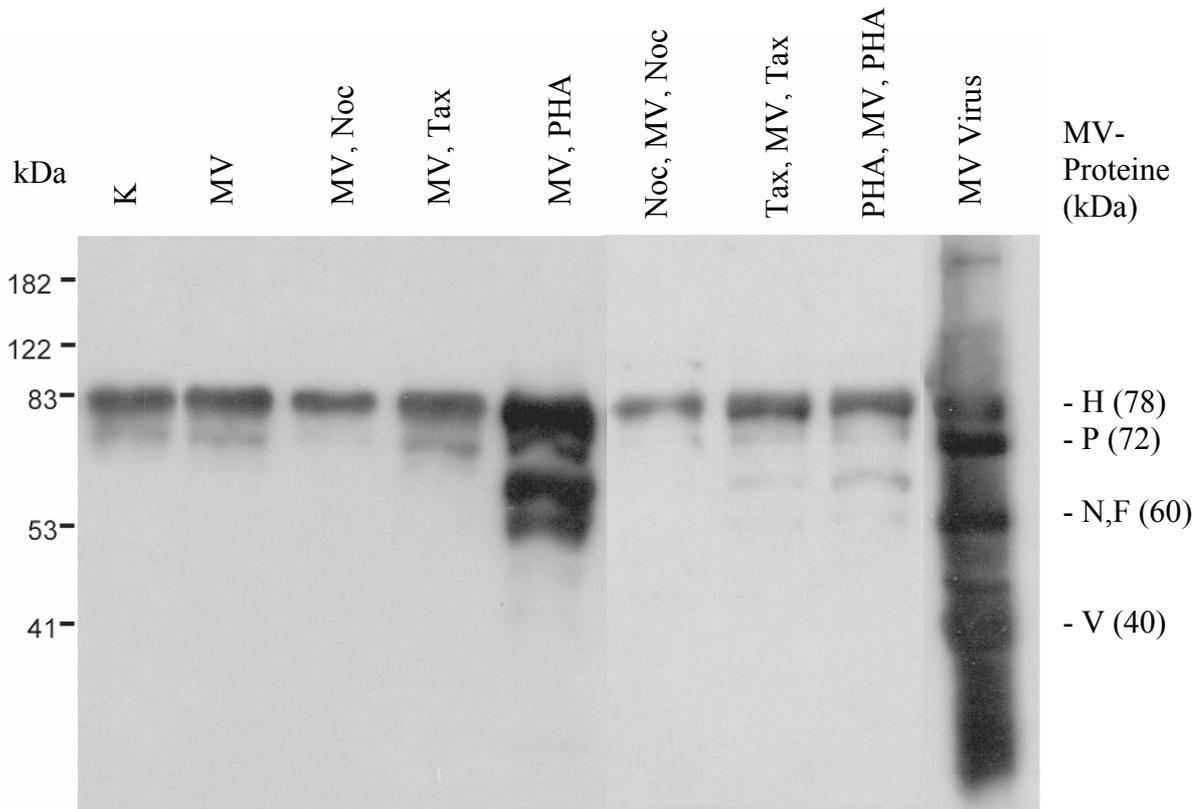
Wie bekannt ist fördert PHA die Proteinsynthese, was die erhöhte Proteinmenge bei erhöhter Virusfreisetzung beweist. Der PHA-Effekt blieb derselbe, auch wenn das Mitogen bereits 1h vor Infektion dem Zellkulturmedium hinzugefügt wurde. Demnach ist die Wirkung des Mitogens nicht vom Zeitpunkt seiner Zugabe abhängig.

Die mit Noc behandelten Zellen lieferten noch weniger Proteine. Da die Plaquetritration derselben Zellen eine verminderte Virusfreisetzung zeigten und daher nicht viele Proteine die Zelle verlassen haben, kann von einer verminderten Produktion durch Noc bzw. durch Tubulindepolymerisation ausgegangen werden.

Nocodazol, das in Vero-Zellen eine stärkere Wirkung zeigte, wenn es vor Infektion zugesetzt wurde, führte in PBMC zu keinen vergleichbaren Resultaten. Die Proteinmenge blieb dieselbe, egal ob Noc vor oder nach Infektion auf die Zellen wirkte.

Im Falle einer Taxol-Exposition war in der Zelle annähernd so viel Protein vorhanden wie in unbehandelten PBMC. Ebenso wurden in etwa gleich viel Virionen freigesetzt, daher scheint die Proteinsynthese durch MT-Stabilisation nicht stimuliert zu werden.

Es zeigte sich jedoch eine leichte Vermehrung von viralen Proteinen in Zellen, die bereits 1h vor MV-Infektion Taxol ausgesetzt waren. In der Plaquetritration waren allerdings keine PFU erkennbar, was fraglich erscheint. Da aber wahrscheinlich nicht viele Virionen freigesetzt wurden, könnte diese Proteinerhöhung durch Akkumulation synthetisierter Proteine zurückzuführen sein.



**Abbildung 22: Darstellung der MV-Proteine im Western Blot-Verfahren: behandelte und unbehandelte PBMC 72 h p.i. sowie reines Virus.**

Die zugesetzten Konzentrationen an Tax und Noc betragen  $20\mu\text{M}$ , PHA  $25\mu\text{g/ml}$ . Ein Teil wurde 1h p.i. den Chemikalien ausgesetzt (MV, Noc/ Tax/ PHA), der andere bereits 1h vor Infektion (Noc/ Tax/ PHA, MV, Noc/ Tax/ PHA). Infiziert wurden die PBMC mit 5 MOI; die Probenentnahme erfolgte 72h p.i.

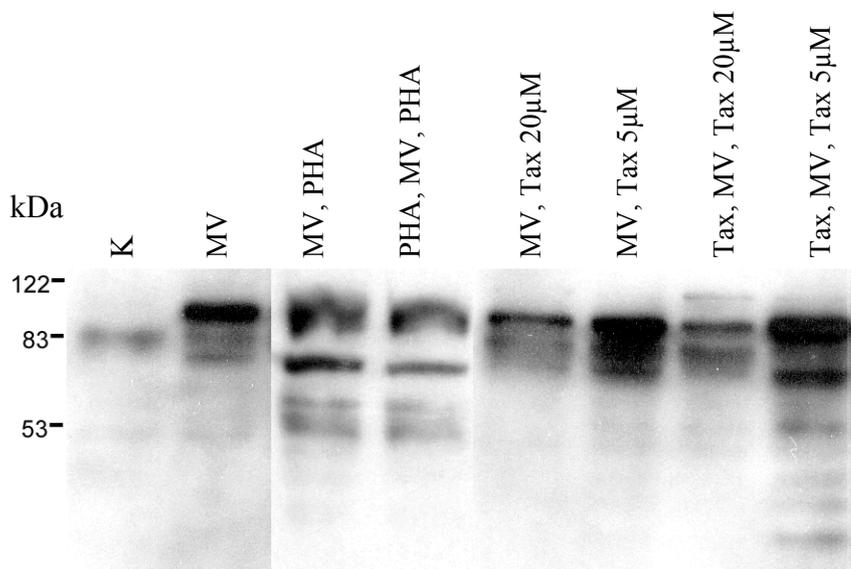
Die Taxol-Wirkung wurde daraufhin näher geprüft. Ein weiteres Mal wurde die Proteinsynthese analysiert, und diesmal wurde Taxol zu verschiedenen Zeitpunkten und in verschiedenen Konzentrationen den PBMC-Kulturen zugesetzt. Zum Vergleich wurde eine gleiche Behandlung mit PHA herangezogen, dessen Wirkung besser bekannt ist (Abbildung 23).

Wie bereits im vorherigen Western Blot zeigte sich kein Unterschied in der Wirkung, wenn PHA vor oder nach Infektion auf die Zellen wirkt, und auch eine Verlängerung der Inkubationszeit der Substanz gegenüber dem vorherigen Experiment auf 2h blieb ergebnislos. Jedes Mal war deutlich eine gleichbleibende Stimulation der Proteinproduktion erkennbar.

Taxol verursachte wiederum keine relevante Erhöhung der Proteinmenge, wenn es nach Infektion zugegeben wurde.

Setzte man allerdings die PBMC-Kulturen bereits 2h vor Infektion dem Mikrotubulus-stabilisierenden Agens aus, ließ sich unverkennbar eine Vermehrung viraler Proteine feststellen. Dieser Effekt wurde vor allem in niedriger Taxol-Konzentration sichtbar.

In der Plaquetitration waren einmal mehr bei keiner der mit Taxol behandelten Zellkulturen eine Virusfreisetzung erkennbar. Daher kann nicht genau entschieden werden, ob die Proteine nur in der Zelle akkumulieren, oder ob tatsächlich eine Stimulation der Virusproteinsynthese statt gefunden hat.



**Abbildung 23: Western Blot von PBMC 72h p.i. zur näheren Analyse der Taxol-Wirkung.**

Die Zellen wurden Tax in unterschiedlichen Konzentrationen (5µM und 20µM) und zu unterschiedlichen Zeitpunkten (1h p.i. und 2h vor Infektion) ausgesetzt. Zum Vergleich wurde PHA ebenfalls zu den Zeiten 1h p.i. und 2h vor Infektion zugesetzt. K bezeichnet eine uninfizierte Kontrollprobe, MV eine unbehandelte Zellkultur.

## 4 Diskussion

---

### 4.1 Die MV-Replikation hängt vom Vorhandensein und von der Menge des F-Aktins ab

In dieser Arbeit untersuchte ich auf Basis der bisherigen Erkenntnisse die Bedeutung des zellulären Aktinskeletts für die Infektion und Replikation mit dem Masernvirus.

Zu diesem Zweck betrachtete ich vor allem den Polymerisationszustand von Aktin und prüfte seine Auswirkung auf die Ausbreitung des Virus in infizierten Vero-Zell- und PBMC-Kulturen. Die Veränderung des Aktinskeletts erfolgte mit den beiden Substanzen Latrunculin A und Jasplakinolid, wobei ersteres die Polymerisation verhindert und letzteres die Aktinfilamente stabilisiert.

#### 4.1.1 *Eine Aktindepolymerisation hemmt die Virusfreisetzung, aber auch das Eindringen des Virus in die Zelle*

Die Freisetzung infektiöser MV-Partikel aus Vero-Zellen nahm stark ab, wenn die Polymerisation zu Aktinfilamenten durch Lat-A verhindert wurde. Dieser Effekt war sowohl in der Plaquetitation als auch in der IP-Färbung deutlich zu erkennen. Allerdings konnte das MV sich trotz einer Behandlung mit Lat-A weiter in der Zellkultur ausbreiten, wenn auch eingeschränkt. Die Ausbreitung erfolgte offenbar über Zell-Zell-Fusion und erzeugte so einen großen Anteil an multinukleären Riesenzellen. Diese Art der Infektionsausbreitung ist jedoch, wie die im Vergleich mit unbehandelten Kulturen geringe Anzahl an Infektionsherden bestätigte, weitaus ineffektiver als die Neuinfektion durch Virionen. Demnach kann davon ausgegangen werden, dass für eine wirklich effiziente Virusausbreitung die filamentäre Aggregationsform des Aktins erforderlich ist.

Zu ähnlichen Erkenntnissen gelangten bereits Stallcup *et al.* 1983, als sie mit Cytochalasin B, einem aktindestabilisierendem Agens, in der Zelle das Assembly von MV verhindern konnten. Das in dieser Arbeit benutzte Latrunculin A hemmt die

Aktinpolymerisation selektiver als das kompetitiv in das Gleichgewicht zwischen Auf- und Abbau eingreifende Cytochalasin B und ermöglicht damit gezieltere Untersuchungen. Meine Experimente mit Lat-A bestätigen die Ergebnisse von Stallcup und ermöglichen eine Eingrenzung der Wirkungsweise von Aktin. Da sowohl Cytochalasin B als auch Lat-A eine verminderte MV-Freisetzung zur Folge hatten, ist wahrscheinlich der Polymerisationszustand von Aktin entscheidend. Dafür spricht besonders auch die Theorie, dass selektives Wachstum am (+)-Ende der Aktinfilamente die MV-Nukleokapside in Richtung der Zytoplasmamembran transportiert (Cudmore *et al.* 1997). Demnach kann ohne F-Aktin das Nukleokapsid nicht zum Ort des Buddings gelangen.

Es sei noch erwähnt, dass eine Vorbehandlung der Vero-Zellen mit Lat-A einen leichten Rückgang der Virusfreisetzung verursachte verglichen mit denjenigen Zellen, die erst nach Infektion behandelt wurden. Dies weist darauf hin, dass Aktin in der Lage ist, bereits die Anfangsschritte im Replikationszyklus des MV zu beeinflussen, sprich die Adsorption und/oder Penetration. Dennoch bleibt seine Hauptwirkung die Beeinflussung der Virusfreisetzung. Um Klarheit über die Rolle des Aktins für den Viruseintritt in die Zelle zu gewinnen, müssen weitergehende Experimente gemacht werden.

#### ***4.1.2 Der Anteil an F-Aktin beeinflusst die Empfänglichkeit der Zelle für die MV-Infektionen***

PBMC sind bekannt dafür, dass sie keine produktive Maserninfektion unterstützen. Erst eine Aktivierung durch Mitogene ermöglicht eine effektive virale Replikation.

Aber neben PHA konnte auch Jaspla die Virusfreisetzung aus den mononukleären Zellen steigern. Dies beweist, dass Aktin für die Replikation des Masernvirus benötigt wird, und dass eine Erhöhung des Angebots an F-Aktin die Infektion erleichtert. In Anbetracht dessen könnte die geringe Menge an polymerisiertem Aktin in ruhenden Lymphozyten eine Ursache für deren begrenzte Infizierbarkeit sein. Für diese Theorie spricht überdies die Tatsache, dass die Aktivierung der PBMC durch das Mitogen PHA mit einer Aktinpolymerisation einher geht (Rao 1984; Melamed *et al.* 1991). Im

Gegensatz dazu besitzen die fibroblastischen Vero-Zellen ein Zytoskelett mit reichlich F-Aktin. Möglicherweise macht gerade der hohe Anteil an polymerisiertem Aktin die Epithelzellen derart empfänglich für die MV-Infektion und gestattet eine ungehinderte Virusfreisetzung.

Demnach scheint nicht nur das Vorhandensein der filamentären Form des Aktins für die Infektion mit dem Masernvirus wichtig zu sein, sondern auch die Größe des Anteil an der Gesamtmenge des zellulären Aktins mag eine Rolle spielen.

## **4.2 Der Polymerisationszustand von Tubulin beeinflusst die MV-Infektion**

Nach bisherigen Untersuchungen ist Tubulin ein Kofaktor der RNA-abhängigen RNA-Polymerase des Masernvirus und notwendig für dessen Replikation (Moyer *et al.* 1988; Moyer *et al.* 1990, Chattopadhyay and Bannerjee 1988, Hamaguchi *et al.* 1985).

In meinen Experimenten untersuchte ich die grundlegende Frage, ob der Polymerisationszustand des Tubulin die Replikation des MV beeinflusst. Zur gezielten Veränderung des mikrotubulären Zellskeletts benutzte ich zwei Chemikalien: Nocodazol zu seiner Destabilisierung und Taxol zu seiner Stabilisierung.

### ***4.2.1 Eine intakte Mikrotubulusfunktion erscheint erforderlich für den Transport der viralen Proteine zur Zellmembran***

Nocodazol verminderte deutlich die Virusfreisetzung sowohl aus PBMC als auch aus Vero-Zellen und konnte somit die MV-Ausbreitung hemmen, wenn auch nicht völlig stoppen. Da bisher davon ausgegangen wurde, dass Tubulin vor allem zur Transkription des MV-Genoms und damit zur Proteinsynthese benötigt wird, nahm ich an, dass eine Infektionshemmung durch Nocodazol vor allem auf dieser Ebene statt findet. Dieser Annahme entgegen standen jedoch die Ergebnisse aus den Versuchen mit Taxol: Weder in Vero-Zellen noch in PBMC konnte die Stabilisierung der Mikrotubuli die in der Plaquetitration gemessene Virusfreisetzung fördern. In der IP-Färbung infizierter Zellen

konnte ebenfalls keine gesteigerte Streuung des MV bemerkt werden, da eine Taxol-Behandlung die Anzahl an infizierten Foci nicht zu erhöhen vermochte. Statt dessen trat der gegenteilige Effekt ein, und weniger Virionen konnten die infizierte Zelle verlassen. Die Tatsache, dass in der IP-Färbung fast gleiche Zahlen an Foci sowohl bei Taxol- als auch bei Nocodazol-Exposition zu beobachten waren, lässt vermuten, dass beide Substanzen eine gemeinsame, synchrone Wirkung haben müssen.

In Anbetracht dessen ist von Interesse, dass eine 1995 durchgeführte Immunfluoreszenzfärbung von Vero-Zellen durch Avitabile *et al.* nähere Kenntnisse über die Auswirkung einer Nocodazol- sowie Taxol-Behandlung auf die Organisation der MT brachte. Die Wirkung von Noc erwies sich als sehr stark und führte zu einer totalen Destruktion, so dass Tubulin sich nur noch diffus in der gesamten Zelle verteilte. Dagegen verursachte Tax eine Bündelung der Mikrotubuli und ebenfalls einen Verlust der typischen Architektur, allerdings wirkte es weniger intensiv als Noc. Beide Substanzen führten damit zu einer Zerstörung der ursprünglichen Organisationsform der MT in der Zelle. Diese Zerstörung hat offensichtlich einen Funktionsverlust der MT zur Folge und lässt vermuten, dass Nocodazol und Taxol den tubulären Transport verhinderten. Unter anderem transportieren die MT Vesikel vom Golgi-Apparat zur Zellmembran. Da die viralen Proteine H und F bekanntlich im Golgi modifiziert und anschließend zur Membran befördert werden, ist es denkbar, dass durch die chemische Behandlung eben dieser Transport zum Erliegen kam. Damit wäre nicht genügend H und F in der Zytoplasmamembran der Wirtszelle vorhanden, um das Budding zu ermöglichen, und die Proteine akkumulieren in der Zelle.

Ein Ausweichen der akkumulierten Virusproteine auf den passiven Transportmechanismus der Diffusion erscheint wenig wahrscheinlich, wenn man bedenkt, dass durch die Zusammensetzung des Zytoplasmas die Diffusion von Partikeln, die größer sind als 50nm, erschwert ist (Luby-Phelps 1994). Auf diesem Wege können folglich nur wenige Viruspartikel die Zellmembran erreichen. Ferner ist die Diffusion kaum gerichtet, da einzig der Konzentrationsgradient die Richtung bestimmt, wohingegen ein Transport entlang der MT gezielt zur Zellperipherie und zum Ort des Buddings hin führt. Ein gerichteter Transport ist notwendig für eine reibungslose und effektive Vermehrung des Virus.

Andere Arbeiten mit verschiedenen Viren berichten in ähnlicher Weise, dass MT für den intrazellulären Transport viraler Bestandteile während der Replikation verantwortlich sind.

In Epithelzellen wurde bereits beobachtet, dass der Transport zur apikalen Membran von einer intakten MT-Funktion abhängig ist (Lafont *et al.* 1994). Zusätzlich konnte Nocodazol die Freisetzung des zu den Paramyxoviren gehörigen Humanen Parainfluenzavirus Typ 3, die vor allem an der apikalen Membran statt findet, stark hemmen (Bose *et al.* 2001).

Experimente mit Nocodazol zeigten weiterhin, dass die Depolymerisation der MT den Transport von Vesikeln zur apikalen Zytoplasmamembran beeinträchtigt (Breitfeld *et al.* 1990). Norrild *et al.* beobachteten bereits 1986 die zytoskelettären Veränderungen in humanen Fibroblasten während einer Infektion mit dem Herpes Simplex Virus Typ 1 (HSV-1). Dabei blieb die Organisation des Intermediärfilaments Vimentin unbeeinflusst, Aktin und Tubulin zeigten jedoch eine im Verlauf zunehmende Bindung an die viralen Glykoproteine. Taxol wie Nocodazol führten zu einer Akkumulation der Proteine in der Zelle, und Norrild zufolge sind der intrazelluläre Transport der HSV-Glykoproteine und die Bildung infektiöser Viren abhängig von intakten MT.

Angesichts dessen ist es nicht unwahrscheinlich, dass auch die Freisetzung des Masernvirus das Vorhandensein eines funktionierenden mikrotubulären Transportsystems erfordert.

#### ***4.2.2 Existiert ein mikrotubulärer Transport des viralen Genoms von der Eintrittspforte zum Replikationsort?***

Bereits nach Eintritt des Virus in seine Wirtszelle muss das freigesetzte Genom zum Ort der Transkription und Replikation gelangen, denn die notwendigen zellulären Faktoren sind nicht ubiquitär im Zytoplasma verfügbar. Die virale Replikation findet in Kernnähe statt, und genau dort befindet sich auch das MTOC. Daher liegt die Vermutung nahe, dass das Genom mittels Mikrotubuli transportiert wird, wie es bei anderen Viren bereits nachweislich der Fall ist. Die Kapside des HSV-1 konnten nach Infektion in nächster Nähe zum MTOC lokalisiert werden, und eine Behandlung mit Noc verhinderte dies

(Sodeik *et al.*, 1997). Auch das Adenovirus Typ 2 assoziiert direkt nach Infektion mit den MT fibroblastischer Zellen (Suomalainen *et al.*, 1999). Für beide Viren wird angenommen, dass MT die Infektion unterstützen und das Genom des HSV bzw. Adenovirus zu den Nuklei der Wirtszelle transportieren (Mabit *et al.* 2002).

Dieser Transport erfolgt demnach vom in der Zellperipherie befindlichen Plus-Ende der MT zu deren auf das MTOC gerichtete Minus-Ende. Welche Art des mikrotubulären Transportes hierfür verwendet wird, ist unklar: eine Depolymerisation der MT könnte ebenso eine Rolle spielen wie das Minusendmotorprotein Dynein. Allerdings wird letztere Möglichkeit zur Zeit favorisiert (Sodeik 1997; Suomalainen *et al.* 1999; Smith and Enquist 2002).

Um mit Sicherheit zu bestätigen, dass das MV in ähnlicher Weise transportiert wird, sind weitergehende Experimente erforderlich. Allerdings weisen meine Ergebnisse bereits in diese Richtung: so konnte nicht nur die Vorbehandlung mit Nocodazol die Anzahl der Foci noch drastischer senken als eine postinfektiöse Behandlung – wurden die Vero-Zellen vor Infektion Taxol ausgesetzt, war eine nahezu identische Anzahl von MV-positiven Foci beobachtbar. Demzufolge scheint eine Funktionsminderung der MT bereits zu Beginn die MV-Replikation zu erschweren. Dies könnte ein erster Hinweis darauf sein, dass neben dem HSV und dem Adenovirus auch das Masernvirus die MT als Transportmittel für sein Genom benutzt.

#### ***4.2.3 Die Fusion infizierter Zellen zu Synzytien nimmt unter Mikrotubulus-Stabilisation zu***

Wenn auch die Freisetzung in gleicher Weise durch Taxol und Nocodazol behindert wurde, war die Wirkung der beiden Substanzen nicht vollkommen gleich. So waren in der IP-Färbung dennoch Unterschiede in der Virusausbreitung erkennbar. Die MV-positiven Herde der Taxol-exponierten Vero-Zellkulturen erschienen größer als bei Nocodazol-Behandlung, und auch größer als in den unbehandelten Kulturen. Somit scheint die Polymerisation von Tubulin die Virusausbreitung zumindest in der Hinsicht zu begünstigen, dass sie eine Zunahme von Zell-Zell-Fusionen bewirkt. Obwohl die viralen Proteine H und F durch den gehemmten mikrotubulären Transport und durch das

damit verhinderte Budding in der Zelle akkumulieren, scheinen sie zumindest die Zell-Zell-Fusion einleiten zu können. Die Tatsache, dass diese vermehrte Fusion trotz einer vergleichbaren Hemmung des Transports unter Nocodazol-Wirkung nicht statt findet, ist möglicherweise ein Hinweis darauf, dass die Proteinsynthese vom Polymerisationszustand des Tubulins nicht unbeeinflusst bleibt. Anscheinend lassen depolymerisierte MT weniger Proteinsynthese zu, so dass trotz des gestörten Transportes nicht viel Protein akkumuliert. Daher sinkt neben der Virusfreisetzung auch die Fusion, wie an den kleinen MV-positiven Herden in der IP-Färbung erkennbar war. Die erhöhte Fusion unter dem Einfluss von Taxol könnte umgekehrt daher rühren, dass die Produktion der MV-Proteine doch stimuliert wird, auch wenn eindeutige Beweise hierfür fehlen.

#### ***4.2.4 Eine Destabilisierung der Mikrotubuli hemmt die MV-Proteinsynthese***

Wie die Western Blots zeigen konnten, sinkt die virale Proteinsynthese unter Einfluss von Nocodazol. Offenbar kann keine effektive Produktion von MV-Proteinen statt finden, wenn nicht genügend polymerisiertes Tubulin in der Wirtszelle vorhanden ist. Im Umkehrschluss erwies sich damit ein intaktes MT-Skelett als erforderlich für die Replikation des Virus.

Zudem ist die replikationshemmende Wirkung von Nocodazol stark konzentrationsabhängig. Da die Substanz direkt an  $\beta$ -Tubulin bindet, muss seine Konzentration in der Zelle ausreichend hoch sein, um genügend Monomere von der Polymerisation fern zu halten. Dies scheint zwischen  $10\mu\text{M}$  und  $20\mu\text{M}$  der Fall zu sein, da sich dann die geringsten Mengen an MV-Proteinen bei gleichzeitig niedrigster Virusfreisetzung zeigten.

Eine Behandlung von Vero-Zellen mit Noc vor Infektion behinderte in der Immunperoxidase-Färbung die Virusausbreitung noch stärker als eine Behandlung nach Infektion. Diese Resultate erinnern an die Experimente mit dem aktindestabilisierenden Latrunculin A, das bei einer Vorbehandlung die MV-Freisetzung wirksamer inhibieren konnte. Im Fall von Nocodazol sind die Unterschiede in der Wirkstärke allerdings

größer, was dafür spricht, dass MT zu Beginn des Replikationszyklus von größerer Wichtigkeit sind als Aktinfilamente. Das könnte zum einen darin mitbegründet sein, dass das Genom des MV tatsächlich entlang der MT zum Ort der Transkription und Replikation gebracht wird. Wird der Transport gehemmt, kann das Genom nicht transkribiert bzw. repliziert werden, so dass weniger infektiöse Viruspartikel entstehen. Zum anderen sollte man auch die Möglichkeit in Betracht ziehen, dass polymerisiertes Tubulin zur Proteinsynthese benötigt wird, und dass bei dessen vermindertem Angebot die Produktion von Virusbestandteilen sinkt. Folglich stehen weniger Virusbausteine zur Verfügung und zusätzlich ist ihr Transport zur Membran behindert, so dass nur sehr wenig Virionen frei werden können.

Alles in allem kann ich bestätigen, dass für eine effizienten MV-Proteinsynthese das Tubulin der Wirtszelle benötigt wird, und ergänzend hinzufügen, dass es in polymerisierter Form vorliegen muss. Ob die MT jedoch als Kofaktor für die RNA-Polymerase fungieren, wie es vorherige Arbeiten vermuten lassen, oder ob ein Transport der MV-RNA der entscheidende Faktor ist, muss noch genauer untersucht werden.

Da die Virusausbreitung durch Nocodazol jedoch nicht vollständig zu stoppen war, muss davon ausgegangen werden, dass immer noch ausreichend Virusbestandteile in der infizierten Zelle hergestellt werden konnten und ihr Transport dennoch stattfand.

Auch die Tatsache, dass eine Vorbehandlung mit Nocodazol nur in Vero-Zellen, nicht jedoch in PBMC die oben beschriebene verstärkte Hemmung der Proteinsynthese bewirkte, lässt noch Fragen offen.

#### ***4.2.5 Eine Stimulation der MV-Proteinsynthese durch polymerisiertes Tubulin bleibt unklar, aber nicht unwahrscheinlich***

Wenn Nocodazol durch Depolymerisation von MT die Infektion hemmt, scheint es nur richtig und sinnvoll, wenn Taxol diese im Gegenzug durch Polymerisation fördert. Die Ergebnisse aus meinen Versuche mit Taxol entsprachen jedoch nicht den Erwartungen: In der Analyse der Proteinsynthese konnte keine Stimulation durch Taxol festgestellt werden, wenn es bereits infizierten Zellen zugesetzt wurde. In diesem Fall blieb eine

Stabilisierung der Mikrotubuli gänzlich ohne Wirkung. Erst eine Vorbehandlung der PBMC brachte positive Ergebnisse im Sinne einer deutlichen Vermehrung von viralen Proteinen in der Zelle. Eine Verlängerung der präinfektiösen Wirkzeit von Tax konnte die Menge an MV-Proteinen noch weiter erhöhen. Die Frage ist, ob eine gesteigerte Proteinsynthese dabei eine Rolle spielt, oder ob hierfür die Akkumulation von MV-Proteinen durch gestörten Transport verantwortlich ist. Wieder sei darauf hingewiesen, dass eine Depolymerisation von MT die Proteinproduktion senkt, und dass die Akkumulation unter Nocodazol die Virusproteinmenge in der Zelle nicht erhöht. Daher ist die Steigerung durch polymerisiertes Tubulin nicht auszuschließen.

Dass Taxol nur dann die Proteinmenge merklich erhöht, wenn es lange vor Infektion den mononukleären Zellen zugesetzt wird, kann viele Ursachen haben und bedarf weiterer Experimente. Dennoch ist dies ein Anhaltspunkt dafür, dass die Polymerisation von Tubulin durchaus in der Lage ist, die MV-Proteinsynthese zu steigern.

Die Annahme, dass Tubulin zur Synthese erforderlich ist, wird durch die vorherigen Arbeiten unterstützt, die eine Rolle des zellulären Tubulins als Kofaktor der RNA-Polymerase vermuten lassen. In meinen Versuchen konnte zudem Nocodazol durch Depolymerisation der Mikrotubuli eine Senkung der Proteinsynthese bewirken, und so gehe ich davon aus, dass die gezeigte Steigerung der MV-Proteinmenge nach Vorbehandlung mit Taxol unter anderem auf die Aktivierung der Proteinsynthese durch polymerisiertes Tubulin zurückzuführen ist.

Nimmt man dies als wahrscheinlich an, könnte eine unterschiedliche Stabilität der Mikrotubuli mit verantwortlich sein für das ungleich starke Ansprechen auf die MV-Infektion in den verschiedenen Zelltypen. So konnte nachgewiesen werden, dass die Mikrotubuli in Epithelien weit weniger Dynamik zeigen als in Fibroblasten (Pepperkok *et al.* 1990; Shelden and Wadsworth 1993). Damit enthalten Epithelzellen viel stabiles bzw. dauerhaft polymerisiertes Tubulin und bieten dem eindringenden MV reichlich Kofaktor. PBMC dagegen bilden kein derartig starres Zytoskelett aus, da dieses ihre Beweglichkeit einschränkt. Die dynamische Instabilität ist in den mononukleären Blutzellen daher hoch und könnte eine RNA-Polymerisation dadurch erschweren.

### **4.3 Aktin und Tubulin sind erforderliche zelluläre Faktoren für eine effektive MV-Replikation**

In einer zusammenfassenden Betrachtung vorheriger Veröffentlichungen und der Ergebnisse meiner Arbeit lässt sich sagen, dass das Masernvirus sich nur dann effektiv replizieren kann, wenn in der Wirtszelle sowohl Aktin als auch Tubulin in polymerisierter Form zur Verfügung stehen.

So halte ich es für wahrscheinlich, dass die filamentäre Aggregationsform des Aktins in der Wirtszelle notwendig für eine effiziente Replikation des Masernvirus ist, insbesondere für den Durchtritt des Virus durch die Zellmembran während des Buddings. Ferner spielen Aktinfilamente eine noch unklare Rolle während des Eindringens des Virus in die Wirtszelle.

Darüber hinaus scheint der Höhe des Anteils an polymerisiertem Aktin die Produktivität der MV-Infektion zu beeinflussen, so dass der Mangel an F-Aktin die Infektion der PBMC limitiert. PHA und Jaspla beheben diesen Mangel.

Tubulin wird bekanntlich zur viralen Proteinsynthese benötigt. Angenommen wird bisher, dass es als Kofaktor der RNA-abhängigen RNA-Polymerase fungiert, welche die Transkription des MV-Genoms steuert. Demzufolge wäre hierfür die polymerisierte Form des Tubulins notwendig, da eine Depolymerisierung zu einer verminderten Proteinsynthese führte. Ob eine Zunahme an stabilen Mikrotubuli die Replikation fördert, konnte nicht vollständig geklärt werden, bleibt aber wahrscheinlich.

Die hohe dynamische Instabilität in PBMC könnte die Produktion viraler Proteine insofern einschränken, als dass sie der viralen RNA-Polymerase nur wenig dauerhaft stabiles Tubulin als Kofaktor zur Verfügung stellen kann.

Daneben scheinen MT eine nicht unwesentliche Rolle für den Transport von MV-Bestandteilen zu spielen. Während G-Aktin das Matrixprotein und das Nukleokapsid bindet und diese offenbar mittels Elongation zur Zellmembran transportiert (Cudmore *et al.* 1997), könnten MT für den Transport des Hämagglutinins und des Fusionsproteins zur Zellmembran verantwortlich sein, wo die Proteine anschließend eingebaut werden (vergleiche Tashiro 1993). Eine Bindung von transmembranärem H und F an das M-

Protein leitet schließlich das Budding ein. Folglich erfordert die Virusfreisetzung die Anwesenheit dieser beiden Zytoskelettkomponenten.

Ferner könnte nach dem Uncoating ein Transport des MV-Genoms über MT zur Replikation in Kernnähe erfolgen. Da die Minusenden der MT zum MTOC gerichtet sind, wäre ein gerichteter Transport durch Vermittlung von Motorproteinen denkbar: Dem entsprechend würde Dynein die RNA transportieren, und Kinesin die MV-Glykoproteine H und F.

In Bezugnahme auf die Veröffentlichungen von Sodeik 2000 und Smith and Enquist 2002 sei noch hinzugefügt, dass MT wohl den Transport über längere Distanzen bewerkstelligen, Aktin dagegen über kurze.

#### **4.4 Vorstellung eines MV-Replikationszyklus in Abhängigkeit vom Zytoskelett**

Die Replikation des MV verläuft nach einem schon lange bekannten Schema. Damit dieses auch reibungslos und immer identisch ablaufen kann, müssen seine einzelnen Schritte auf irgendeine Weise koordiniert werden. Ein wichtiger Schritt ist der Transport der Virusbestandteile in jenen Bereich der Zelle, in dem Assembly und Budding erfolgen. Der andere und zugleich letzte Schritt des Zyklus ist das Budding an sich und die Freisetzung der replizierten Viren. All dies erfordert ein Zusammenspiel der einzelnen Virus- und Zellkomponenten. Von zentraler Bedeutung sind dabei die Interaktion zwischen M-Protein und Zellmembranproteinen, von M-Protein und Nukleokapsid sowie die Interaktionen der Masernproteine mit dem Aktin- und Tubulinskelett der Wirtszelle.

Betrachtet man nun den Replikationszyklus des Masernvirus in Verbindung mit meinen Ergebnissen und vorangegangenen Veröffentlichungen, lässt sich die folgende erweiterte Vorstellung eines Replikationszyklus entwerfen (vergleiche dazu Abbildung 24):

Nach der Adsorption fusioniert das MV mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle und entlässt bei der Penetration das Nukleokapsid in die Zelle. Darauf folgt das Uncoating,

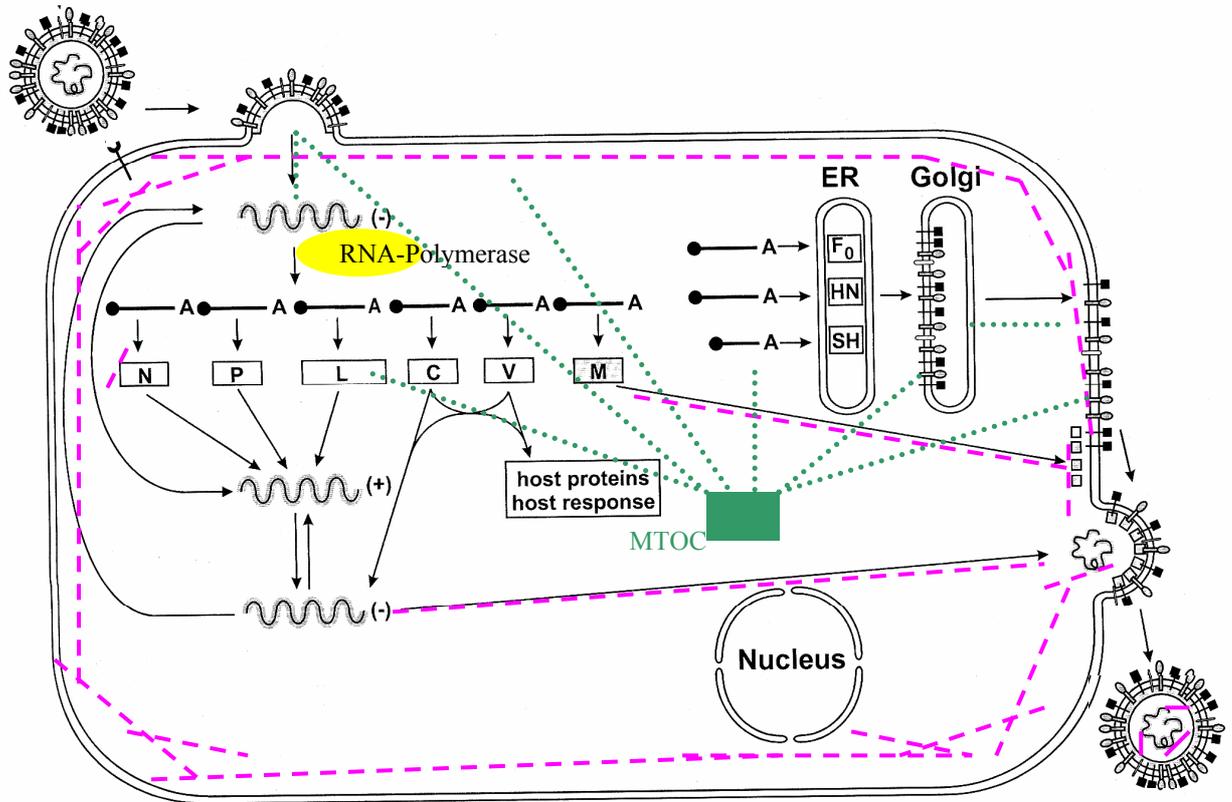
das Freisetzen des viralen Genoms aus dem Nukleokapsid. Entlang der Mikrotubuli wird die negativsträngige RNA in Kernnähe transportiert, wo sich auch das MTOC befindet. Auf diesem Weg würde das Genom nicht nur gezielt zum Ort der Replikation und Transkription gelangen, sondern ebenso die RNA-abhängige RNA-Polymerase in direkte Nähe zu polymerisiertem Tubulin, das vermutlich als deren Kofaktor fungiert.

Nach der Transkription folgt mit der Translation die Synthese der Virusproteine an den Ribosomen der Zelle. Dabei werden N, P, L, C, V und M an freien Ribosomen translatiert, während H und F an den Ribosomen des rauen ER gebildet werden. Von dort aus werden sie zum Golgi-Apparat transportiert und weiter modifiziert. Vom Golgi-Apparat aus erfolgt ein vesikulärer Transport der viralen Glykoproteine entlang der MT hin zur Zytoplasmamembran und ihr anschließender Einbau.

N assoziiert mit replizierter (-)-RNA zum Ribonukleoprotein RNP, an das wiederum P und L als Untereinheiten der RNA-Polymerase binden und L vermutlich auch an Tubulin. An diesen Komplex lagert sich zudem noch das M-Protein an, welches gleichzeitig die RNA-Synthese inhibiert. Das Nukleokapsid und das Matrixprotein assoziieren wahrscheinlich mit dem G-Aktin der Wirtszelle und werden über Elongation am Plusende zur Membran gebracht. Anschließend bindet M an die zytoplasmatischen Anteile der F- und H-Proteine in der Plasmamembran und setzt so das Budding in Gang.

In den polarisierten Epithelzellen mag der geschilderte Ablauf anders aussehen, da zum einen kein MTOC im eigentlichen Sinne existiert und die Minusenden der MT auf die apikale Seite ausgerichtet sind. Bekannt ist, dass das MV auf der apikalen Seite in die Wirtszelle eintritt, so dass ein Plusendtransport zum Replikationsort notwendig wäre. Das Budding wiederum erfolgt bidirektional aus der apikalen und der basolateralen Seite.

Daher bleibt die Frage offen, wie der mikrotubuläre Transport der MV-Bestandteile detailliert aussieht und wie er reguliert wird.



**Abbildung 24: Replikationszyklus des MV in Abhängigkeit vom Zytoskelett.**

Rosa: Aktinfilamente. Grün: Mikrotubuli. Für weitere Erläuterungen siehe Text und Abbildung 5.

## 4.5 Die PHA-induzierte Aktivierung der PBMC wird durch Jasplakinolid und Taxol gehemmt

Neben dem eigentlichen Ziel meiner Arbeit, der Untersuchung des Zytoskeletts auf die MV-Replikation, konnte ich beobachten, dass die mitogene Wirkung durch PHA sowohl durch die Aktin- als auch durch die Tubulin-polymerisierende Substanzen Jasplakinolid bzw. Taxol gehemmt wird.

Geht man davon aus, dass nicht nur PHA sondern auch Jaspla die Infektion in PBMC steigert, sollte der gleichzeitige Einsatz beider Chemikalien eine starke MV-Replikation verursachen.

Interessanterweise verhinderte Jaspla jedoch die PHA-Stimulation, und die Virusfreisetzung entsprach in etwa derer in nur mit Jaspla behandelten Kulturen. Offenbar konnte also Jaspla seine Wirkung entfalten, PHA aber nicht.

Zur Erklärung dieses Phänomens muss man sich den Wirkmechanismus beider Substanzen näher anschauen. Jaspla organisiert das F-Aktin vor allem in der Zellperipherie, und dadurch blockiert es die in der Zellmembran eingebetteten  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle (Patterson RL *et al.* 1999). Diese wiederum werden durch die Freisetzung von  $\text{Ca}^{2+}$  aus dem ER proliferierender Zellen aktiviert (Patterson RL *et al.* 1999). Eben diese endoplasmatische  $\text{Ca}^{2+}$ -Freisetzung ist Teil des PHA-Effekts. Jaspla hemmt also die Wirkung des Mitogens. Bleibt die Frage, warum es die PHA-Stimulation völlig unterdrückte. Da beide Substanzen gleichzeitig zugegeben wurden, hätte PHA die Gelegenheit gehabt, zumindest den Teil der  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle zu öffnen, der noch nicht durch die F-Aktin-Aggregate blockiert wird. Ursache dafür ist wohl die unterschiedliche Geschwindigkeit, mit der die Substanzen in die Zelle eindringen: Jaspla passiert die Zellmembran per Diffusion (Bubb *et al.* 1994; Patterson RL *et al.* 1999) und kann so relativ schnell seine Wirkung entfalten. PHA dagegen tritt rezeptorvermittelt in das Zytoplasma ein (Rao 1984) und wirkt deshalb langsamer. Wenn nun also sowohl Jaspla als auch PHA in das Medium der Zellkultur gegeben werden, blockiert das schnell wirkende Jaspla die  $\text{Ca}^{2+}$ -Kanäle, bevor PHA diese aktivieren kann. Das Mitogen bleibt wirkungslos.

Ebenso wurde die PHA-Stimulation der PBMC durch Taxol stark vermindert. Dies kann zwei Ursachen haben, die beide eine synergistische Rolle spielen: Zum einen können die vermehrt synthetisierten MV-Proteine nicht in die Zellmembran eingebaut werden, da ihr Transport gestört ist. Damit wird die Freisetzung infektiöser Viruspartikel eingeschränkt, was die geringe Anzahl an PFU/ml in der Plaquetitration mit PHA und Taxol behandelter PBMC-Kulturen erklärt. Zum anderen ist Taxol für seine antimitotische Wirkung bekannt. Die extreme Stabilisation der Mikrotubuli schränkt die Funktionstüchtigkeit der Mitosespindel ein und blockiert damit die Zellteilung. PHA als Mitogen wirkt in die entgegengesetzte Richtung und fördert eine Proliferation. Bei gleichzeitiger Zugabe zum Kulturmedium wirken die beiden Substanzen antagonistisch, und offenbar überwiegt dabei die antimitotische Wirkung des Taxols. Hierfür mögen wiederum Unterschiede in der Wirkgeschwindigkeit von Bedeutung sein. Diese Mitosehemmung verhindert die Vermehrung aktivierter PBMC und dadurch die hohe Produktion und Freisetzung neuer Virionen.

## 5 Zusammenfassung

---

Schon seit langem wird vermutet, dass die Replikation des Masernvirus von den Proteinen der Wirtszelle abhängig ist. Vor allem den Komponenten des Zytoskeletts wurde dabei eine wichtige Rolle zugeschrieben. Aktin wurde bereits früh als erforderlicher Faktor für das Budding beschrieben, da zum einen eine Depolymerisation mit Cytochalasin B die Virusfreisetzung verhindern konnte und zum anderen Aktin als einziges Wirtszellprotein in den Virionen nachweisbar war. Tubulin hingegen schien insbesondere für die Transkription und Replikation des MV-Genoms von Bedeutung zu sein und als Kofaktor der RNA-abhängigen RNA-Polymerase zu dienen. Eine Transportfunktion der Mikrotubuli für das MV wurde bislang nicht beschrieben, allerdings wurde in jüngster Zeit für immer mehr Viren bekannt, dass eintretende bzw. austretende Viruspartikel das mikrotubuläre Transportsystem für ihre Zwecke nutzen.

Mit meiner Arbeit konnte ich zeigen, dass Aktin in polymerisierter Form vorliegen muss, um das Budding zu ermöglichen, und dass ein Mangel an G-Aktin, wie er in PBMC vorliegt, die Virusfreisetzung limitiert. Jasplakinolid und PHA bewirken beide durch Erhöhung des Angebots an filamentärem Aktins eine produktive Infektion.

In Bezug auf Tubulin erwies sich die Depolymerisation als hemmend auf die Proteinsynthese, wobei der gegenteilige Effekt durch Stabilisation der polymeren Form nicht eindeutig bewiesen werden konnte.

Allerdings stellte sich heraus, dass eine intakte mikrotubuläre Transportfunktion für die effektive Virusfreisetzung erforderlich zu sein scheint. Ähnlich wie das Sendai Virus könnte auch das MV sein Hämagglutinin und Fusionsprotein über MT vom Golgi-Apparat zur Zellmembran befördern.

Die Zell-Zell-Fusion und die Riesenzellbildung, die ebenfalls von H und F abhängt, wird durch gestörten mikrotubulären Transport jedoch nicht wesentlich beeinflusst, da ein Teil der akkumulierten Virusproteine auch ohne eine intakte MT-Funktion zur Membran gelangen konnte. Ob sie dorthin diffundieren oder auf einen alternativen Transportmechanismus wie beispielsweise Aktin ausweichen, erfordert weitere Untersuchungen.

Außerdem führte ein durch Taxol gesteigertes Angebot an polymerem Tubulin zu einer vermehrten Zell-Zell-Fusion, während die Zerstörung der MT durch Nocodazol nur wenige Riesenzellen entstehen ließ. Eine Ursache könnte in einer unterschiedlich hohen Proteinsynthese liegen.

Die Beeinflussung der ersten Schritte des Replikationszyklus konnte für Aktin, vor allem aber für Tubulin nachgewiesen werden, so dass ein Transport des viralen Genoms zum Ort seiner Replikation entlang der MT möglich wäre. Ob dieser Transport durch Polymerisation bzw. Depolymerisation erfolgt, oder ob die Motorproteine dafür genutzt werden, ist unklar, und ebenso, wie das MV ihn für seine Zwecke regelt.

## 6 Literaturverzeichnis

---

**Aaby P, Andersen M, Sodemann M, Jakobsen M, Gomes J, and Fernandes M** 1993. Reduced childhood mortality after standard measles vaccination at 4-8 months compared with 9-11 months of age. *Bmj*. **307**:1308-11.

**Alberts B, Bray D, Lewis J *et al.*** (ed.) 1994. *Molecular Biology of the Cell*. New York: Garland Publishing Inc. 3<sup>rd</sup> edition: 787-834.

**Allen IV, McQuaid S, McMahon J, Kirk J, and McConnell R** 1996. The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol*. **55**:471-80.

**Armas-Portela R, Parrales MA, Albar JP, Martínez-A C, and Avila J** 1999. Distribution and characteristics of betaII tubulin-enriched microtubules in interphase cells. *Exp Cell Res*. 1999. **248**:372-80.

**Attibele N, Wyde PR, Trial J, Smole SC, Smith CW, and Rossen RD** 1993. Measles virus-induced changes in leukocyte function antigen 1 expression and leukocyte aggregation: possible role in measles virus pathogenesis. *J Virol*. **67**:1075-9.

**Aversa G, Chang CC, Carballido JM, Cocks BG, and de Vries JE** 1997a. Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol*. **158**:4036-44.

**Aversa G, Carballido J, Punnonen J, Chang CC, Hauser T, Cocks BG, and de Vries JE** 1997b. SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses. *Immunol Cell Biol*. **75**:202-5.

**Ayscough K** 1998. Use of latrunculin-A, an actin monomer-binding drug. *Methods Enzymol*. **298**:18-25.

**Bedows E, Rao KM, and Welsh MJ** 1983. Fate of microfilaments in vero cells infected with measles virus and herpes simplex virus type 1. *Mol Cell Biol*. **3**(4):712-9.

**Black FL** 1989. Measles active and passive immunity in a worldwide perspective. *Prog Med Virol*. **36**:1-33.

**Blau DM, and Compans RW** 1995. Entry and release of Measles virus are polarized in epithelial cells. *Virol*. **210**:91-9.

**Blumberg BM, Leppert M, and Kolakofsky D** 1981. Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell*. **23**:837-45.

**Bohn W, Rutter G, Hohenberg H, Mannweiler K, and Nobis P** 1985. Involvement of Actin Filaments in Budding of Measles Virus: Studies on Cytoskeletons of Infected Cells. *Virol*. **149**: 91-106.

**Bose S, Malur A, and Bannerjee AK** 2001. Polarity of Human Parainfluenza Virus Type 3 Infection in Polarized Human Lung Epithelial A549 Cells: Role of Microfilament and Microtubule. *J Virol*. **75**:1984-9.

- Boyum A** 1968. Isolation of mononuclear cells and granulocytes from human blood. Isolation of mononuclear cells by one centrifugation, and of granulocytes by combining centrifugation and sedimentation at 1g.  
Scand J Clin Lab Invest Suppl. **97**: 77-89
- Bradford MM** 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding.  
Anal Biochem **72**:248–254.
- Breitfeld PP, McKinnon WC, and Mostov KE** 1990. Effect of nocodazole on vesicular traffic to the apical and basolateral surfaces of polarized MDCK cells.  
J Cell Biol. **111**:2365-73.
- Bubb RM, Spector I, Beyer BB, and Fosen KM** 2000. Effects of Jasplakinolide on the Kinetics of Actin Polymerization – An Explanation for certain *in vivo* Observations.  
J Biol Chem. **275**:5163-70.
- Buchholz, CJ, Koller D, Devaux P, Mumenthaler C, Schneider-Schaulies J, Braun W, Gerlier D, and Cattaneo R** 1997. Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46  
J Biol Chem. **272**:22072-9.
- Buchholz CJ, Schneider U, Devaux P, Gerlier D, and Cattaneo R** 1996. Cell entry by measles virus: long hybrid receptors uncouple binding from membrane fusion.  
J Virol. **70**:3716-23.
- Bulinski JC, and Gundersen GG** 1991. Stabilization of post-translational modification of microtubules during cellular morphogenesis.  
Bioessays. **13**:285-93.
- Burke E, Dupuy L, Wall C, and Barik S** 1998. Role of cellular actin in the gene expression and morphogenesis of human respiratory syncytial virus.  
Virology. **252**: 137-48.
- Cathomen T, Naim H Y, and Cattaneo R** 1998. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence.  
J Virol. **72**:1224-34.
- Cattaneo R, Rebmann G, Baczko K, ter Meulen V, and Billeter MA** 1987. Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains.  
Virology **160**:523-526.
- Cattaneo R, Schmid A, Spielhofer P, Kaelin K, Baczko K, ter Meulen V, Pardowitz J, Flanagan S, Rima BK, Udem SA, et al.** 1989. Mutated and hypermutated genes of persistent measles viruses which caused lethal human brain diseases.  
Virology **173**:415-25.
- CDC (Center of Disease Control)** 2002. Measles.  
CDC Pink Book: 96-114.
- Chattopadhyay D, and Bannerjee AK** 1988. NH<sub>2</sub>-terminal acidic region of the phosphoprotein of vesicular stomatitis virus can be functionally replaced by tubulin.  
Proc Natl Sci U S A. **85**:7977-81.
- Chiu W** 1997. Biophysics of microtubules.  
J Struct Biol. **118**:83-168.

**Ciofi degli Atti M, and Salamaso S** 2003. New measles epidemic in southern Italy: 1217 cases reported to sentinel surveillance, January-May 2003. *Eurosurveillance Weekly* 2003: 030703.

**Cocks, BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, and Aversa G** 1995. A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature*. **376**:260-3.

**Cudmore S, Reckmann I, and Way M** 1997. Viral manipulations of the actin cytoskeleton. *Trends Microbiol.* **5**: 142-8.

**Darnell J, Lodish H, and Baltimore D** (ed.) 1990. *Molecular Cell Biology*. New York: Scientific American Books, Freeman and Company. 816-99.

**Davison AJ, and Elliott RM** (ed.) 1993. *Molecular Virology – A Practical Approach*. Oxford: Oxford University Press.

**Devaux P, Loveland B, Christiansen D, Milland J, and Gerlier D** 1996. Interactions between the ectodomains of haemagglutinin and CD46 as a primary step in measles virus entry. *J Gen Virol.* **77**:1477-81.

**Drechsler DN, and Kirschner MW** 1994. The minimum GTP cap required to stabilize microtubules. *Curr Biol.* **4**:1053-61.

**Doerr HW, und Gehrlich WH** (Hrg.) 2002. *Medizinische Virologie*. Stuttgart: Georg Thieme Verlag, 1. Auflage.

**Dorig RE, Marcil A, Chopra A, and Richardson CD** 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* **75**:295-305.

**Dorig RE, Marcil A, and Richardson CD** 1994. CD46, a primate-specific receptor for measles virus. *Trends Microbiol.* **2**:312-8.

**Drenckhahn D, und Zenker W** (Hrg.) 1994. *Beninghoff Anatomie, Band 1*. München: Urban & Schwarzenberg. 15., völlig neu bearbeitete Auflage. 33-45.

**Duclos P., and Ward BJ** 1998. Measles vaccines. A review of adverse events. *Drug Experience* **6**: 435-54.

**Duclos P, and Ward BJ** 1998. Measles vaccines: a review of adverse events *Drug Saf.* **19**:435-54.

**Duprex PW, McQuaid S, and Rima KR** 1999. Measles Virus-Induced Disruption of the Glial-Fibrillary-Acidic Protein Cytoskeleton in an Astrocytoma Cell Line (U-251). *J Virol.* **74**: 3874-80

**Eisenthal A, Marder O, Lifschitz-Mercer B, Skornick Y, Fixler D, Avtalyon R, Tirosh R, and Deutsch M** 1997. Influenza A virus affects the response of human peripheral blood mononuclear cells to phytohaemagglutinin A by altering the cytoskeleton. *Pathobiol.* **65**:69-74

**Enders JF** 1962. Measles virus: historical review, isolation and behavior in various systems. *Am J. Dis. Child.* **103**: 282-287.

- Erlenhoefter C, Wurzer WJ, Loffler S, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V, and Schneider-Schaulies J** 2001. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition.  
J Virol. **75**:4499-505.
- Erlenhoefter C**, 2002. Identifikation von SLAM (CD150) als zellulären Rezeptor für Masernviren. Universität Würzburg: Dissertation.
- Esolen, LM, Ward BJ, Moench TR, and Griffin DE** 1993. Infection of monocytes during measles.  
J Infect Dis. **168**:47-52.
- Fagraeus A, Tyrrell DL, Norberg R, and Norrby E** 1978. Actin filaments in paramyxovirus-infected human fibroblasts studied by indirect immunofluorescence.  
Arch Virol. **57**:291-6.
- Forthal DN, Aarnaes S, Blanding J, de la Maza L, and Tilles JG** 1992. Degree and length of viremia in adults with measles.  
J Infect Dis. **166** :421-4
- Garenne, M, Leroy O, Beau JP, and Sene I** 1991. Child mortality after high-titre measles vaccines: prospective study in Senegal.  
Lancet. **338**:903-7.
- Gay, N** 2000. Eliminating measles – no quick fix.  
Bulletin of the World Health Organization. **78**(8):949
- Gerlier D, Loveland B, Varior-Krishnan G, Thorley B, McKenzie IF, and Roubourdin-Combe C** 1994. Measles virus receptor properties are shared by several CD46 isoforms differing in extracellular regions and cytoplasmic tails.  
J Gen Virol. **75**:2163-71.
- Gerlier D, Varior-Krishnan G, and Devaux P** 1995. CD46-mediated measles virus entry: a first key to host-range specificity.  
Trends Microbiol. **3**:338-45.
- Gibbs EP, Gibbs EL, Carpenter PR, and Spies HW** 1959. Encephalographic abnormality in "uncomplicated" childhood diseases.  
JAMA **171**:1050-1055
- Graves M, Griffin DE, Johnson RT, Hirsch RL, de Soriano IL, Roedenbeck S, and Vaisberg A** 1984. Development of antibody to measles virus polypeptides during complicated and uncomplicated measles virus infections  
J Virol. **49**:409-12.
- Gresser J, and Chany C** 1963. Isolating measles virus from the washed leucocytic fraction of blood.  
Proc Soc Exp Biol Med. **113**:695-8.
- Griffin DE** 1995. Immune responses during measles virus infection  
Curr Top Microbiol Immunol. **191**:117-34.
- Griffin DE, and Bellini WJ**, 2001, Measles Virus.  
In: Knipe DM, Howley PM, *et al.*(eds), Fields Virology.  
Philadelphia: Lippincott Williams and Wilkins. 4<sup>th</sup> edition: 1305-1334.
- Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, and Vaisberg A** 1989. Immune activation in measles.  
N Engl J Med. **320**:1667-72.

- Griffin DE, Ward BJ, Jauregui E, Johnson RT, and Vaisberg A** 1990. Natural killer cell activity during measles.  
Clin Exp Immunol. **81**:218-224
- Griffin JA, and Compans RW** 1979. Effect of Cytochalasin B on the maturation of enveloped viruses.  
J Exp Med. **150**: 379-391.
- Guiffre RM, Tovell DR, Kay CM, and Tyrrell DLJ** 1982. Evidence for an Interaction between the Membrane Protein of a Paramyxovirus and Actin.  
J Virol. **42**: 963-8.
- Hamaguchi M, Nishikawa K, Toyoda T, Yoshida T, Hanaichi T, and Nagai Y** 1985. Transkriptive complex of Newcastle Disease virus. II. Structural and functional assembly associated with the cytoskeletal framework.  
Virol. **147**:295-308.
- Hanninen P, Arstila P, Lang H, Salmi A, and Panelius M** 1980. Involvement of the central nervous system in acute, uncomplicated measles virus infection.  
J Clin Microbiol. **11**:610-3.
- Helin E, Salmi A, Vanharanta R, and Vainionpaa R** 1999. Measles virus replication in cells of myelomonocytic lineage is dependent on cellular differentiation stage.  
Virol. **253**:35-42.
- Hara S, Kimura H, Hoshino Y, et al.** 2003. Combination therapy with intraventricular interferon-alpha and Ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis and monitoring measles virus RNA by quantitative PCR assay.  
Brain Dev. **25**(5): 367-9.
- Hirokawa N** 1998. Kinesin and dynein superfamily proteins and the mechanism of organelle transport.  
Science **279**:519-26.
- Hu A, Cattaneo R, Schwartz S, and Norrby E** 1994. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein.  
J. Gen. Virol. **75**:1043-1052.
- Hu A, Cathomen T, Cattaneo R, and Norrby E** 1995. Influence of N-linked oligosaccharide chains on the processing, cell surface expression and function of the measles virus fusion protein.  
J Gen Virol. **76**:705-10.
- Hyypia T, Korkiamaki P, and Vainionpaa R** 1985. Replication of measles virus in human lymphocytes.  
J Exp Med. **161**:1261-71.
- Jahnke U, Fischer EH, and Alvord EC Jr.** 1985. Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis.  
Science. **229**:282-4.
- Johnstone RW, Russell SM, Loveland BE, and McKenzie IF** 1993. Polymorphic expression of CD46 protein isoforms due to tissue-specific RNA splicing.  
Mol Immunol. **30**:1231-41.
- Karp CL, Wysocka M, Wahl LM, Ahearn JM, Cuomo PJ, Sherry B, Trinchieri G, and Griffin DE** 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus.  
Science. **273**:228-31.

- Kempe CH, and Fulginiti VA** 1965. The pathogenesis of measles virus infection. Arch. Ges. Virusforsch. **16**:103-128.
- Kingsbury DW** (ed.) 1991. The Paramyxoviruses. New York: Plenum Press.
- Kirschner M, and Schulze E** 1986. Morphogenesis and the control of microtubule dynamics in cells. J Cell Sci Suppl. **5**:293-310.
- Krantic S, Gimenez C, and Rabourdin-Combe C** 1995. Cell-to-cell contact via measles virus haemagglutinin-CD46 interaction triggers CD46 downregulation. J Gen Virol. **76**:2793-800.
- Laemmli, UK** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4. Nature **227**:680-685
- Lafont F, Burhardt JK, and Simons K** 1994. Involvement of microtubule motor proteins in basolateral and apical transport in kidney cells. Nature **372**:801-3.
- Lawrence DM, Vaughn MM, Belman AR, Cole JS, and Rall GF** 1999. Immune response-mediated protection of adult but not neonatal mice from neuron-restricted measles virus infection and central nervous system disease. J Virol. **73**:1795-801.
- Leopardi R, Hukkanen V, Vainionpaa R, Salmi A** 1993. Cell proteins bind to sites within the 3' noncoding region and the positive-strand leader sequence of measles virus RNA. J Virol. **67**:785-90.
- Leopardi R, Hyypia T, and Vainionpaa R** 1992a. Effect of interferon- $\alpha$  on measles virus replication in human peripheral blood mononuclear cells. APMIS. **100**: 125-31
- Leopardi R, Vainionpaa R, Hurme M, Siljander P, and Salmi A** 1992b. Measles virus infection enhances IL-1 $\beta$  but reduces tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in human monocytes. J Immunol. **149**: 2397-2401.
- Lightwood R, and Nolan R** 1970. Epithelial giant cells in measles as an aid in diagnosis. J. Pediatr. **77**: 59-64.
- Liszewski MK, Post TW, and Atkinson JP** 1991. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster Annu Rev Immunol. **9**:431-55.
- Liszewski MK, Tedja I, and Atkinson JP** 1994. Membrane cofactor protein (CD46) of complement. Processing differences related to alternatively spliced cytoplasmic domains. J Biol Chem. **269**:10776-9.
- Luby-Phelps K** 1994. Physical properties of cytoplasm. Curr Opin Cell Biol. **6**:3-9.
- Lydy SL, Bsak S, and Compans RW** 1990. Host cell-dependent lateral mobility of viral glycoproteins. Microb Pathog. **9**(6): 375-86.
- Mabit H, Nakano MY, Prank U, Saam B, Dohner K, Sodeik B, and Greber UF** 2002. Intact microtubules support adenovirus and herpes simplex virus infections. J Virol. **76**:9962-71.

**Maisner A, Schneider-Schaulies J, Liszewski MK, Atkinson JP, and Herrler G** 1994. Binding of measles virus to membrane cofactor protein (CD46): importance of disulfide bonds and N-glycans for the receptor function.  
J Virol. **68**:6299-304.

**Malvoisin E, and Wild TF** 1993. Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins  
J Gen Virol. **74**:2365-72.

**Manchester M, Liszewski MK, Atkinson JP, and Oldstone MBA** 1994. Multiple isoforms of CD46 (membrane cofactor protein) serve as receptors for measles virus.  
Proc Natl Acad Sci U S A. **91**:2161-5.

**Manchester M, Naniche D, et al.** 2000  
CD46 as a measles receptor: form follows function.  
Virology **274**(1): 5-10.

**Manchester M, Valsamakis A, et al.** 1995  
Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). Proc Natl Acad Sci U S A. **92**(6): 2303-7.

**McChesney MB, and Oldstone MBA** 1987. Viruses perturb lymphocyte functions: selected principles characterizing virus-induced immunosuppression.  
Annu Rev Immunol. **5** :279-304.

**Mejillano MR, Shivanna BD, and Himes RH** 1996. Studies on the nocodazole-induced GTPase activity of tubulin.  
Arch Biochem Biophys. **336**:130-8.

**Melamed I, Downey GP, Aktories K, and Roifman CM** 1991. Microfilament assembly is required for antigen-receptor-mediated activation of human B lymphocytes.  
J Immunol. **147**:1139-46.

**Mitchison T, and Kirschner M** 1984. Microtubule assembly nucleated by isolated centrosomes.  
Nature. **312**:232-7.

**Modrow S, und Falke D** 2003 Molekulare Virologie, 2. Auflage  
Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.

**Moench TR, Griffin DE, Obriecht CR, Vaisberg AJ, and Johnson RT** 1988. Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA.  
J Infect Dis. **158**:433-42.

**Moyer SA, Baker SC, and Horikami SM** 1990. Host cell proteins required for measles virus reproduction.  
J Gen Virol. **71**: 775-83.

**Moyer SA, Baker SC, and Lessard JL** 1988. Tubulin: a factor necessary for the synthesis of both Sendai virus and vesicular stomatitis virus RNAs.  
Proc Natl Acad Sci U S A. **83**:5405-9

**Mrkic B, Pavlovic J, Rulicke T, Volpe P, Buchholz CJ, Hourcade D, Atkinson JP, Aguzzi A, and Cattaneo R** 1998. Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice.  
J Virol. **72**:7420-7.

**Nabi IR** 1999. The polarization of the motile cell.  
J Cell Sci. **112**:1803-11.

- Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, and Gerlier D** 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus.  
J Virol. **67**:6025-32.
- Neumann T, Kirschstein SO, Camacho Gomez JA, Kittler L, and Unger E** 2001. Determination of the net exchange rate of tubulin dimer in steady-state microtubules by fluorescence correlation spectroscopy.  
Biol Chem. **382**:387-91.
- Nichols KE** 2000. X-linked lymphoproliferative disease: genetics and biochemistry. Rev Immunogenet. **2**:256-66.
- Norrild B, Lehto VP, and Virtanen I** 1986. Organization of cytoskeleton elements during herpes simplex virus type 1 infection of human fibroblasts: an immunofluorescence study.  
J Gen Virol. **67**:97-105.
- Ogata A, Czub S, Ogata S, Cosby S L, McQuaid S, Budka H, ter Meulen V, and Schneider-Schaulies J** 1997. Absence of measles virus receptor (CD46) in lesions of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) brains.  
Acta Neuropathol. **94**:444-449.
- Ogimoto M, Arimura Y, et al.** 2001. Opposing regulation of B cell receptor-induced activation of mitogen-activated protein kinases by CD46.  
FEBS Lett **490**(1-2): 97-101.
- Okada H, Kobune F, Sato TA, Kohama T, Yakeuchi Y, Abe T, Takayama N, Tsuchiya T, and Tashiro M** 2000. Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients.  
Arch Virol. **145**:905-920.
- Ono N, Tatsuo H, Tanaka K, Minagawa H, and Yanagi Y** 2001. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor.  
J Virol. **75**:1594-600.
- Patterson JB, Manchester M, and Oldstone MB** 2001. Disease model: dissecting the pathogenesis of the measles virus.  
Trends Mol Med. **7**:85-8.
- Patterson JB, Thomas D, Lewicki H, Billeter MA, and Oldstone MBA** 2000. V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo.  
Virology. **267**:80-9.
- Patterson RL, van Rossum DB, and Gill DL** 1999. Store-operated Ca<sup>2+</sup> entry: evidence for a secretion-like coupling model.  
Cell. **98**:487-99.
- Payment P, and Trudel M** (ed.) 1993. Methods and Techniques in Virology.  
New York: Marcel Dekker Inc.
- Pepperkok R, Bre MH, Davoust J, and Kreis TE** 1990. Microtubules are stabilized in confluent epithelial cells but not in fibroblasts.  
J Cell Biol. **111**:3003-12.
- Pschyrembel, Klinisches Wörterbuch** 1997.  
De Gruyter, 258. Auflage, Version 1.

- Punnonen J, Cocks BG, Carballido JM, Bennett B, Peterson D, Aversa G, and de Vries JE** 1997. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J. Exp Med.* **185**:993-1004.
- Rao KM** 1984. Lectin-induced actin polymerization in human lymphocytes: possible signal for mitogenesis. *Cell Immunol.* **83**:181-8.
- Robert Koch-Institut** 2002. Übersicht zum Masernausbruch in Coburg. *Epidemiologisches Bulletin.* **19**:155-6.
- Robert Koch-Institut** 2002. Masern. Ratgeber Infektionskrankheiten – Merkblätter für Ärzte. [http://www.rki.de/INFEKT/INF\\_A-Z/RAT\\_MBL/RATMBL2.HTM](http://www.rki.de/INFEKT/INF_A-Z/RAT_MBL/RATMBL2.HTM)
- Robert Koch-Institut** 2003. Zu einem aktuellen Masernausbruch im Landkreis Verden (Niedersachsen). *Epidemiologisches Bulletin.* **5**:34-35.
- Roberts PC, and Compans RW** 1998. Host cell dependence of viral morphology. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **95**:5746-51.
- Rose, A.** 2003. Measles eliminating in Finland since 1996 – will it last? *Eurosurveillance Weekly.* **7**: 030116.
- Sanchez-Lanier M, Guerin P, McLaren LC, Billeter M, and ter Meulen V** 1988. Measles virus-induced suppression of lymphocyte proliferation. *Cell Immunol.* **116**:367-381.
- Sayos J, Wu C, et al.** 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature.* **395**:462-9.
- Salonen R, Ilonen J, and Salmi A** 1989. Measles virus inhibits lymphocyte proliferation in vitro by two different mechanisms. *Clin Exp Immunol.* **75**:376-80.
- Schlender J, Schnorr JJ, Spielhoffer P, Cathomen T, Cattaneo R, Billeter MA, ter Meulen V, and Schneider-Schaulies S** 1996. Interaction of measles virus glykoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **93**:13194-9.
- Schmid A, Spielhofer P, Cattaneo R, Bacsko K, ter Meulen V, and Billeter MA** 1992. Subacute sclerosing panencephalitis is typically characterized by alterations in the fusion protein cytoplasmic domain of the persisting measles virus. *Virology.* **188**:910-15.
- Schneider-Schaulies J** 2000. Cellular receptors for viruses: links to tropism and Pathogenesis. *J Gen Virol.* **81**:1413-29.
- Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Kobune F, Rima B, and ter Meulen V** 1995b. Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J Virol.* **69**:7257-9.

- Schneider-Schaulies J, Schnorr JJ, Brinckmann U, Dunster LM, Baczko K, Liebert UG, Schneider-Schaulies S, and ter Meulen V** 1995a. Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **92**:3943-7.
- Schneider-Schaulies S, Kreth HW, Hofman G, Billeter M, and ter Meulen V** 1991. Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE and autoimmune diseases. *Virology.* **182**:703-11.
- Schneider-Schaulies S, Liebert UG, Baczko K, and ter Meulen V** 1990. Restricted expression of measles virus in primary rat astroglial cells. *Virology.* **177**:802-6.
- Schneider-Schaulies S, Liebert UG, Segev Y, Rager-Zisman B, Wolfson M, and ter Meulen V** 1992. Antibody-dependent transcriptional regulation of measles virus in persistently infected neural cells. *J Virol.* **66**:5534-41.
- Schneider-Schaulies S, Niewiesk S, Schneider-Schaulies J, and ter Meulen V** 2001. Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms. *Curr Mol Med.* **1**:163-81.
- Schnorr JJ, Dunster LM, Nanan R, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S, and ter Meulen V** 1995. Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur J Immunol.* **25**:976-84.
- Schnorr JJ, Seufert M, Schlender J, Borst J, Johnston IC, ter Meulen V, and Schneider-Schaulies S** 1997a. Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression in vitro. *J Gen Virol.* **78**:3217-26.
- Schnorr JJ, Xanthakos S, Keikavoussi P, Kampgen E, ter Meulen V, and Schneider-Schaulies S** 1997b. Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:5326-31.
- Seya T, Hara T, Matsumoto M, Sugita Y, and Akedo H** 1990. Complement-mediated tumor cell damage induced by antibodies against membrane cofactor protein (MCP, CD46). *J Exp Med.* **172**:1673-80.
- Shelden E, and Wadsworth P** 1993. Observation and quantification of individual microtubule behaviour in vivo: microtubule dynamics are cell-type specific. *J Cell Biol.* **120**:935-45.
- Smith GA, and Enquist LW** 2002. Break Ins and Break Outs: Viral Interactions with the Cytoskeleton of Mammalian Cells. *Annu Rev Cell Dev Biol.* **18**:135-61.
- Sodeik B** 2000. Mechanisms of viral transport in the cytoplasm. *Trends Microbiol.* **8**:465-72.
- Sodeik B** 2002. Unchain my heart, baby let me go – the entry and intracellular transport of HIV. *J Cell Biol.* **159**:393-5.
- Sodeik B, Ebersold MW, and Helenius A** 1997. Microtubule-mediated transport of incoming herpes simplex virus 1 capsids to the nucleus. *J Cell Biol.* **136**:1007-21.

- Stallcup KC, Raine CS, and Fields BN** 1983. Cytochalasin B inhibits the maturation of measles virus. *Virology* **124**:59-74.
- Stark GR, Kerr IM, Williams BRG, Silverman RH, and Schreiber RD** 1998. How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. **67**:227-264.
- Stidwill RP, and Greber UF** 2000. Intracellular Virus Trafficking Reveals Physiological Characteristics of the Cytoskeleton. *News Physiol Sci*. **15**:67-71.
- Sullivan JL, Barry DW, Lucas SJ, and Albrecht P** 1975. Measles infection of human mononuclear cells. I. Acute infection of peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J Exp Med* **142**:773-84.
- Suomalainen M, Nakano MY, Boucke K, Keller S, Stidwill RP, and Greber UF** 1999. Microtubule-dependent minus and plus end-directed motilities are competing processes for nuclear targeting of adenovirus. *J Cell Biol*. **144**:657-72.
- Suryanarayana K, Baczko K, ter Meulen V, and Wagner RR** 1994. Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol*. **68**:1532-43.
- Takimoto T, and Portner A** 2004. Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Research* **106**:133-45.
- Tanaka K, Minagawa H, Xie MF, and Yanagi Y** 2002. The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Arch Virol*. **147**:195-203.
- Tashiro M, Seto JT, Klenk HD, and Rott R** 1993. Possible involvement of microtubule disruption in bipolar budding of a Sendai virus mutant, F1-R, in epithelial MDCK cells. *J Virol*. **67**:5902-10.
- Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, and Yanagi Y** 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*. **406**:893-7.
- ter Meulen V, and Billeter MA** (eds.) 1995. *Measles Virus*. Berlin: Springer-Verlag.
- ter Meulen V, Stephanson, JR, and Kreth HW** 1983. Subacute sclerosing panencephalitis. Fraenkel-Conrath H, Wagner RR (eds). *Compr. Virol*. **18**:105-159.
- Towbin H, Staehelin T, and Gordon J** 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**:4350-4.
- Tran PT, Joshi P, and Salmon ED** 1997. How tubulin subunits are lost from the shortening ends of microtubules. *J Struct Biol*. **118**:107-18.
- Tyrell DL, and Norrby E** 1978. Structural polypeptides of measles virus. *J Gen Virol*. **39**:219-9.

- Vainionpaa R, and Hyypia T** 1987. Human blood cells for measles virus replication. *Advances in Cell Culture*. **5**:43-58.
- Vainionpaa R, Hyypia T, and Akerman KE** 1991. Early Signal Transduction in Measles Virus-Infected Lymphocytes Is Unaltered, but Second Messengers Activate Replication. *J Virol*. **65**:6743-8.
- Varior-Krishnan G, Trescol-Biemont MC, Nanche D, Rabourdin-Combe C, and Gerlier D** 1994. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms of CD46 display similar measles virus receptor properties: virus binding, fusion, and replication; down-regulation by hemagglutinin; and virus uptake and endocytosis for antigen presentation by major histocompatibility complex class II molecules. *J Virol*. **68**:7891-9.
- Varsanyi, TM., Utter G, and Norrby E** 1984. Purification, morphology and antigenic characterization of measles virus envelope components. *J Gen Virol*. **65**:355-66.
- Vasquez RJ, Howell B, Yvon AM, Wadsworth P, and Cassimeris L** 1997. Nonmolar concentrations alter microtubule dynamic instability in vivo and in vitro. *Mol Biol Cell*. **8**:973-85.
- von Pirquet C** 1908. Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion während der Masern. *Dtsch Med Wochenschr*. **30**:1297-1300
- Waris M, Ziegler T, Kivivirta M, and Ruuskanen O** 1990. Rapid detection of respiratory syncytial virus and influenza A virus in cell cultures by immunoperoxidase staining with monoclonal antibodies. *Clin Microbiol*. **28**:1159-62.
- WHO Homepage** 2002. Measles Elimination Home.  
<http://www.who.dk/eprise/main/WHO/Progs/MEP/Home>
- Wild TF, Malvoisin E, and Buckland R** 1991. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol*. **72**:439-42.
- Wrzos H, Kulczycki J, Laskowski z, Matacz D, and Brzosko WJ** 1979. Detection of measles virus antigen(s) in peripheral lymphocytes from patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Arch Virol*. **60**:291-7.
- Yanagi Y, Cubitt BA, and Oldstone MBA** 1992. Measles inhibits mitogen-induced T cell proliferation but does not directly perturb the T cell activation process inside the cell. *Virol*. **187**:280-9.

## 7 Abkürzungsverzeichnis

---

### A

ADP	Adenosindiphosphat
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat

### B

bp	Basenpaare
BME	Basal Medium Eagle
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise

### C

C	Kohlenstoffatom
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca <sup>2+</sup>	2-wertiges Calciumion
CPE	zytopathischer Effekt
C-Terminus	carboxyterminales Ende

### D

Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure

### E

EEG	Elektroenzephalogramm
ECL	enhanced chemiluminescence
ELISA	enzyme-linked immunoassay
engl.	englisch
ER	Endoplasmatisches Retikulum

### F

F	Fusionsprotein des MV
F-Aktin	Aktinfilament, polymere Form
FKS	fötales Kälberserum

### G

g	Gramm
G-Aktin	globuläres Aktin, monomere Form
GDP	Guanosinmonophosphat
GFAP	saures Gliofilamentprotein
g/l	Gramm pro Liter
GTP	Guanosintriphosphat

<b>H</b>	
H	Hämagglutininprotein des MV
h	Stunde
H <sub>2</sub> O	Wasser
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Wasserstoffperoxid
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HRP	Horseradish-Peroxidase (horseradish = engl. für Meerrettich)
HSV	Herpes Simplex Virus

<b>I</b>	
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IP	Immunperoxidase

<b>J</b>	
Jaspla	Jasplakinolide

<b>K</b>	
k	Kilo; 10 <sup>3</sup>
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton

<b>L</b>	
l	Liter
Lat-A	Latrunculin A
Lsg.	Lösung

<b>M</b>	
m	Milli, 10 <sup>-3</sup>
M	Molar; mol/l
M	Matrixprotein des MV
MAP	Mikrotubulus-Assoziierende Proteine
MCP	Membran-Kofaktor-Protein
mg	Milligramm
Mg <sup>2+</sup>	2-wertiges Magnesiumion
μ	Mikro, 10 <sup>-6</sup>
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MG	Molekulargewicht
min	Minute
MOI	multiplicity of infection; infektiöse Dosis
m-RNA	messenger-RNA
MT	Mikrotubuli
MTOC	microtubule-organizing center; Zentrosom
MV	Masernvirus

<b>N</b>	
n	nano, 10 <sup>-9</sup>
N	Nukleokapsidprotein des MV
N	Stickstoffatom
ng	Nanogramm
noc	Nocodazol
N-Terminus	aminoterminales Ende
<b>O</b>	
O	Sauerstoffatom
O <sub>2</sub>	Sauerstoffmolekül
<b>P</b>	
P	Phosphoprotein des MV
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBMC	peripheral blood mononuclear cells; mononukleäre Zellen des peripheren Blutes
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFU	plaque forming unit; plaquebildende Einheit
p.i.	post infection
<b>R</b>	
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	rotations per minute; Umdrehungen pro Minute
RPMI	RPMI 1640 Zellkulturmedium
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT	Raumtemperatur
<b>S</b>	
SDS	sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SLAM	Signaling Lymphocyte Activation Molecule
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis
<b>T</b>	
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-hydroxymethyl-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-hydroxymethyl-Aminomethan-Hydrochlorid
<b>U</b>	
ü/N	über Nacht
UV	Ultraviolett
<b>W</b>	
WB	Western Blot

**Z**  
ZNS

Zentrales Nervensystem

# 8 Verzeichnis der Abbildungen und Tabellen

---

## 8.1 Abbildungen

Abbildung 1: Zeitlicher Krankheitsverlauf bei Masern. ....	7
Abbildung 2: Familie der Paramyxoviridae und ihre wichtigsten Vertreter. ....	12
Abbildung 3: Schematische Darstellung eines Masernvirus. ....	13
Abbildung 4: Schematische Darstellung des MV-Genoms. ....	18
Abbildung 5: Replikationszyklus der Paramyxoviren. ....	20
Abbildung 6: Aufbau der zellulären Rezeptoren CD46 und CD150. ....	23
Abbildung 7: Verteilung der zytoskelettären Filamentsysteme in der Zelle. ....	24
Abbildung 8: Mikrotubulus. ....	26
Abbildung 9: Mikrotubulärer Transport mittels Motorproteine. ....	28
Abbildung 10: Aktin. ....	31
Abbildung 11: Strukturformel von Latrunculin A. ....	51
Abbildung 12: Strukturformel von Jasplakinolid. ....	51
Abbildung 13: Strukturformel von Nocodazol. ....	52
Abbildung 14: Strukturformel von Taxol. ....	52
Abbildung 15: Anzahl der Foci in IP-gefärbten, MV-infizierten Vero-Zellkulturen. ....	65
Abbildung 16: IP-Färbung MV-infizierter Vero-Zellen 72h p.i. ....	66
Abbildung 17: Western Blot zur Darstellung der MV-Proteine in infizierten und mit Nocodazol behandelten Vero-Zellen. ....	68
Abbildung 18: Anzahl der Foci in IP-gefärbten MV-infizierten Vero-Zellen zur Illustration der Nocodazol-Wirkung. ....	70
Abbildung 19: Immunperoxidase-Färbung von Vero-Zellen 48h p.i. ....	72
Abbildung 20: Immunperoxidase-Färbung von Vero-Zellen 72h p.i. ....	73
Abbildung 21: Immunperoxidase-Färbung von Vero-Zellen 96h p.i. ....	74
Abbildung 22: Darstellung der MV-Proteine im Western Blot-Verfahren: behandelte und unbehandelte PBMC 72 h p.i. sowie reines Virus. ....	78
Abbildung 23: Western Blot von PBMC 72h p.i. zur näheren Analyse der Taxol- Wirkung. ....	79
Abbildung 24: Replikationszyklus des MV in Abhängigkeit vom Zytoskelett. ....	92

## 8.2 Tabellen

Tabelle 1: Zusammenfassung der MV-Proteine und ihrer Charakteristika.....	17
Tabelle 2: Typen von Intermediärfilamentproteinen.....	29
Tabelle 3: Zellen des menschlichen Blutes.....	37
Tabelle 4: Freisetzung infektiöser MV-Partikel in PBMC unter Jasplakinolid und PHA, untersucht anhand von Plaquetitration.....	63
Tabelle 5: Freisetzung infektiöser MV-Partikel in Vero-Zellen unter Latrunculin A: Plaquetitration.....	64
Tabelle 6: Virusfreisetzung in mit MV infizierten Vero-Zellen unter Nocodazol- Einfluss.....	68
Tabelle 7: MV-Ausbreitung in IP-gefärbten, infizierten Vero-Zellen unter Taxol- Einfluss.....	75
Tabelle 8: Virusfreisetzung in PBMC 72h p.i.: Plaquetitration.....	76

# Danksagung

---

Mein Dank gilt allen, die mich während all der Zeit unterstützt und meine Promotion ermöglicht haben.

Dazu gehören Prof. Dr. Volker ter Meulen und Prof. Aimo Salmi, deren Freundschaft es mir ermöglichte, die Experimente zu dieser Arbeit im virologischen Labor der Universität von Turku durchzuführen.

Dem Labor in Turku und seinen Mitarbeitern gilt ebenfalls ein herzliches „Kiitos“ für die freundliche Aufnahme und das mehr als angenehme Arbeitsklima. Vor allem Heidi Berghäll, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand, und Raija Vainionpää, die mich vor so mancher Verzweiflung rettete, möchte ich besonders danken.

In Würzburg möchte ich mich bei Jürgen Schneider-Schaulies bedanken, der freundlicherweise die Betreuung meiner Promotion in Deutschland übernahm und klaglos meine E-Mail-Bombardements über sich ergehen ließ.

Auch Kerstin Möller, die meine erste Bekanntschaft mit dem Masernvirus und den Labortechniken begleitete, sei an dieser Stelle herzlich gedankt. Genauso danke ich Christian Erlenhöfer für die mehr oder weniger bewusste Unterstützung bei der Niederschrift dieser Arbeit...

Auch Mark Torben Rudolph hat seinen Platz in dieser Danksagung redlich verdient, indem er sich bereitwillig meiner computertechnischen Probleme annahm und die Arbeit überhaupt erst druckreif machte.

Zu guter Letzt sei noch all den aus Platzgründen namentlich unerwähnt bleibenden, aber nicht weniger wichtigen Mitmenschen gedankt, die mich während der gesamten Dauer der Promotion und vor allem während der Phasen der Experimente und der Niederschrift ertrugen, aufmunterten, bekochten und mit Schokolade versorgten.

**Danke! Kiitos!**



# Lebenslauf

---

**Tina Sibylla Bernardi**  
geboren am 13.01.1979  
in Pori/Finnland

## Schulbildung

- 1985-89**            **St. Engelbertschule**  
Grundschule  
59929 Brilon
- 1989-92**            **Gymnasium Petrinum**  
59929 Brilon
- 1992-98**            **Spessart-Gymnasium Alzenau**  
63755 Alzenau
- 1998                *Allgemeine Hochschulreife*

## Hochschulausbildung

- 1998-2005**        **Bayerische Julius Maximilians Universität**  
97070 Würzburg  
Studiengang Humanmedizin
- Herbst 2000*        *Ärztliche Vorprüfung*
- Herbst 2001*        *Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*
- Frühjahr 2004*     *Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*
- Frühjahr 2005*     *Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Approbation*

## Promotion

- September 2001-April 2002**    **University of Turku, Department of Virology**  
20540 Turku, Finland  
*experimenteller Teil* der Arbeit „Bedeutung des Zytoskeletts für die Infektion mit dem Masernvirus, insbesondere des Polymerisationszustandes von Aktin und Tubulin“  
in der Arbeitsgruppe von Heidi Berghäll unter der Leitung von Raija Vainionpää
- April 2002-Frühjahr 2005**    **Universität Würzburg, Institut für Virologie und Immunbiologie, Lehrstuhl für Virologie**  
97078 Würzburg  
Betreuung der Promotion durch Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies