

Die Rolle des CD9 bei der CDV-Infektion

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

vorgelegt von

Erik Schmid

aus

Ichenhausen

Würzburg, 2001

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG	1
1.1 EPIDEMIOLOGIE UND PATHOGENESE DER CDV-INFEKTION	1
1.2 BIOLOGIE DES HUNDESTAUPEVIRUS	3
1.2.1 TAXONOMIE	3
1.2.2 MORPHOLOGIE	4
1.2.3 GENOMAUFBAU	4
1.2.4 FUNKTION DER VIRALEN PROTEINE	5
1.2.5 REPLIKATION DES HUNDESTAUPEVIRUS	7
1.3 CDV-GENOTYPEN UND CHARAKTERISIERUNG DER CDV IMPFSTÄMME	8
1.4 ALLGEMEINES ÜBER VIRUSREZEPTOREN	10
1.5 DAS TETRASPANIN CD9	13
1.5.1 BEDEUTUNG VON CD9 FÜR DIE CDV-INFEKTION	13
1.5.2 STRUKTUR UND BEKANNTE FUNKTIONEN DES CD9	14
1.6 ZIELE DER ARBEIT	16
2. MATERIAL	17
2.1 ZELLEN	17
2.2 VIREN	18
2.3 BAKTERIEN	18
2.4 PLASMIDE	18
2.5 PRIMER	19
2.6 ANTIKÖRPER	19
2.6.1 PRIMÄRANTI-KÖRPER	19
2.6.2 SEKUNDÄRANTI-KÖRPER	20
2.7 MEDIEN, CHEMIKALIEN UND ENZYME	20
2.7.1 ZELLKULTUR	20
2.7.2 BAKTERIENKULTUR	20
2.7.3 ENZYME	20
2.7.4 CHEMIKALIEN	21
2.7.5 RADIOCHEMIKALIEN	21
2.7.6 PEPTIDE	21
2.7.7 FLUORESZENZFARBSTOFFE	21
2.8 LÖSUNGEN UND PUFFER	22
2.9 KITS	22
2.10 VERBRAUCHSMATERIAL	22
2.11 GERÄTE	23
3. METHODEN	25
3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	25
3.1.1 ZELLKULTUR ADHÄRENTER ZELLEN	25
3.1.2 ZELLKULTUR VON SUSPENSIONSZELLEN	25
3.1.3 KULTUR VON HYBRIDOMZELLEN ZUR ANTIKÖRPERGEWINNUNG	25
3.1.4 EINFRIEREN UND AUFTAUEN VON ZELLEN	25
3.1.5 ISOLIERUNG VON PBMC'S AUS VOLLBLUTSPENDEN	26
3.1.6 PHA-STIMULIERUNG VON PBMC'S	26
3.1.7 PROLIFERATIONSASSAY MIT VERO-ZELLEN	26
3.1.8 PROLIFERATIONS-HEMMTEST	27

3.2	VIROLOGISCHE METHODEN	27
3.2.1	CDV-PRODUKTION AUF ADHÄRENTEN ZELLEN	27
3.2.2	NDV-PRODUKTION	28
3.2.3	BESTIMMUNG VON VIRUSTITERN DURCH ENDPUNKTTITRATION	28
3.2.4	PLAQUETEST (SI-CDV-STÄMME)	29
3.2.5	PLAQUEREINIGUNG	29
3.2.6	VIRUSBINDUNGS-ASSAY	29
3.2.7	VIRUSPERMISSIVITÄTSVERSUCHE	30
3.2.8	INFEKTIONS-INHIBITIONS-VERSUCHE MIT ANTIKÖRPERN	30
3.3	HISTOCHEMISCHE METHODEN	31
3.3.1	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN FÜR DIE DURCHFLUSSZYTOMETRIE	31
3.3.2	IMMUNFLUORESCENZFÄRBUNGEN FÜR DIE MIKROSKOPIE	32
3.3.3	REINIGUNG VON MONOKLONALEN ANTIKÖRPERN	32
3.4	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN	33
3.4.1	HERSTELLUNG KOMPETENTER BAKTERIEN	33
3.4.2	TRANSFORMATION VON BAKTERIEN	33
3.4.3	PRÄPARATION VON PLASMID-DNA	33
3.4.4	BESTIMMUNG VON NUKLEINSÄUREKONZENTRATIONEN	34
3.4.5	PLASMID RESTRIKTION	34
3.4.6	DNA- UND RNA-GELELEKTROPHORESE	35
3.4.7	ELEKTROELUTION	35
3.5	VIRUS-AUFNAHME-ASSAY	35
3.5.1	RNA-PRÄPARATION	36
3.5.2	REVERSE TRANSKRIPTION (RT)-PCR ZUM NACHWEIS VON AUFGENOMMENEM VIRUS	36
3.5.3	POLYMERASE-KETTENREAKTION (PCR)	37
3.6	ANALYSE DER VIRALEN PROTEINSYNTHESE	38
3.6.1	³⁵ S-MARKIERUNG	38
3.6.2	IMMUNOPRÄZIPITATION	38
3.6.3	PROTEIN-GELELEKTROPHORESE	39
3.7	ANALYSE DER VIRALEN RNA-SYNTHESE	40
3.7.1	RANDOM PRIMING	40
3.7.2	RNA-DIFFUSIONS-BLOT	41
3.7.3	HYBRIDISIERUNG VON NORTHERN-BLOTS:	41
3.8	FUSIONS-ASSAYS	42
4. ERGEBNISSE		44
<hr/>		
4.1	CHARAKTERISIERUNG DER CD9-EXPRESSION AN DER ZELLOBERFLÄCHE UND IHRER BEDEUTUNG FÜR DIE VIRUSBINDUNG UND DIE INFIZIERBARKEIT VERSCHIEDENER ZELLINIEN	44
4.1.1	KORRELATION VON CD9-EXPRESSION UND VIRUSBINDUNG	44
4.1.2	KORRELATION VON VIRUSBINDUNG UND INFIZIERBARKEIT	46
4.1.3	REGULATION DES K41-EPI TOPS AUF UNINFIZIERTEN UND CDV-INFIZIERTEN VERO-ZELLEN	47
4.1.4	WIRKUNG DES ANTI-CD9-ANTI KÖRPER K41 AUF DIE PROLIFERATION VON VERO-ZELLEN	48
4.2	ANTI-CD9-ANTI KÖRPER BEEINFLUSSEN WEDER DIE BINDUNG VON CDV AN DIE ZIELZELLE NOCH DIE ANSCHLIEBENDE VIRUSAUFNAHME	49
4.2.1	CD9-ANTI KÖRPER HEMMEN NICHT DIE BINDUNG VON CDV AN VERO-ZELLEN	50
4.2.2	DIE AUFNAHME VON CDV DURCH VERO-ZELLEN WIRD DURCH GEGEN CD9 GERICHTETE ANTI KÖRPER NICHT BEEINFLUßT	51
4.3	DIE HEMMUNG DER CDV-INFEKTION DURCH ANTI-CD9-ANTI KÖRPER ERFOLGT IN EINEM SCHRITT NACH DER VIRUSAUFNAHME	53
4.3.1	HEMMEFFEKT VON MAK K41 BEI ZUGABE NACH ERFOLGTER CDV-INFEKTION	53

4.3.2	ANTI-CD9-ANTIKÖRPER HEMMEN DIE CDV-PRODUKTION IN EINEM SCHRITT NACH DER VIRUSAUFNAHME	54
4.3.3	HEMMUNG DER VIRUSFREISETZUNG IM RAHMEN EINER EINSTUFIGEN WACHSTUMSKINETIK	56
4.4	DIE PRODUKTION VIRALER MRNA UND PROTEINE WIRD VON ANTI-CD9-ANTIKÖRPERN NICHT BEEINFLUßT	57
4.4.1	K41 BEEINTRÄCHTIGT NICHT DIE VIRALE MRNA-SYNTHESE	58
4.4.2	DIE VIRALE PROTEINSYNTHESE WIRD VON CD9-ANTIKÖRPERN NICHT INHIBIERT	59
4.5	CD9-ANTIKÖRPER HEMMEN DIE CDV-VERMITTELTE ZELL-ZELL-FUSION	61
4.5.1	CD9-ANTIKÖRPER BEEINFLUßEN DIE FUSION VON UNINFIZIERTEN UND INFIZIERTEN HELA-ZELLEN	61
4.5.1.1	Die Hemifusion wird durch CD9-Antikörpern nicht blockiert	62
4.5.1.2	Die Zell-Zell-Fusion wird durch CD9-Antikörper stark gehemmt	64
4.5.1.3	CD9-Antikörper erzielen ihre Wirkung sowohl auf infizierten als auch auf uninfizierten HeLa-Zellen	65
4.5.2	DURCH DIE HEMMUNG DER CDV-INDUZIERTEN ZELL-ZELL-FUSION WIRD INDIREKT DIE VIRUSPRODUKTION IM SPÄTEREN VERLAUF DER CDV-INFESTION INHIBIERT	68
4.5.2.1	Das fusionshemmende Peptid FIP (Z-fFG) hemmt auch die CDV-vermittelte Zell-Zell-Fusion	68
4.5.2.2	Die Hemmung der CDV-induzierten Zell-Zell-Fusion reduziert indirekt die Menge an viraler m-RNA zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion	69
4.5.3	CD9-ANTIKÖRPER HEMMEN DIE CDV-INFESTION NICHT IN FURIN-DEFIZIENTEN ZELLEN	71
4.6	DER HEMMEFFEKT VON ANTI-CD9-ANTIKÖRPERN IST ABHÄNGIG VOM VERWENDETEN CDV-STAMM	72
4.6.1	PERSISTENT MIT EINEM NICHT-SYNZYTIUMINDUZIERENDEN CDV-STAMM INFIZIERTE ZELLEN FUSIONIEREN NICHT MIT UNINFIZIERTEN ZELLEN.	73
4.6.2	ANTI-CD9-ANTIKÖRPER HEMMEN NICHT DIE INFESTION DER NSI-CDV-STÄMME	74
4.7	WIRKUNG VON MAK K41 AUF DIE VIRUSPRODUKTION PERSISTENT INFIZIERTER ZELLEN	75
4.8	UNTERSUCHUNGEN ZUR PROLIFERATIONSHEMMUNG VON LYMPHOZYTEN MIT CDV	76
4.8.1	UV-INAKTIVIERTES CDV HEMMT DIE PROLIFERATION HUMANER LYMPHOZYTEN	77
4.8.2	PROLIFERATIONSHEMMUNG VON LYMPHOZYTEN MIT PERSISTENT INFIZIERTEN HELA-ZELLEN	77
4.9	UNTERSUCHUNGEN ZUR BETEILIGUNG ANDERER FUSIONSREGULIERENDER MOLEKÜLE AN DER CDV-INDUZIERTEN ZELL-ZELL-FUSION	79
4.9.1	BETEILIGUNG VON FRP-1 BEI DER CDV-INDUZIERTER ZELLFUSION ?	79
4.9.1.1	Wirkung von FRP-1 und CD9-Antikörper auf die NDV-induzierte Zell-Zell-Fusion	79
4.9.1.2	Wirkung von FRP-1-Antikörpern auf die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion	83
4.9.2	SPIELEN RGD-BINDEnde INTEGRINE BEI CDV EIN ROLLE BEI DER VIRUSBINDUNG ODER DER ZELL-ZELL-FUSION ?	84
4.9.2.1	RGD-Peptide haben keinen Einfluß auf die Bindung von CDV an Vero-Zellen	85
4.9.2.2	Einfluß von RGD-Peptiden auf die Virus-induzierte Zell-Zell-Fusion	86
5. DISKUSSION		87
5.1	CD9 IST NICHT AN DER VIRUSBINDUNG UND AUFNAHME BETEILIGT	87
5.2	ERMITTLUNG DES SCHRITTES IN DER VIRUSREPLIKATION, DER DURCH CD9-ANTIKÖRPER GEHEMMT WIRD	90
5.3	MODELL DER FUSIONSVORGÄNGE IN DER FAMILIE DER PARAMYXOVIRIDAE	91
5.4	WELCHE ROLLE SPIELT CD9 BEI ZELL-ZELL-FUSIONSVORGÄNGEN?	98
5.4.1	DIE CDV-INDUZIERTER ZELL-ZELL-FUSION UNTERSCHIEDET SICH VON DER VIRUS-ZELL-FUSION	99
5.4.2	CD9 IST AUCH AN DER REGULATION NICHT VIRAL INDUZIERTER ZELLFUSIONEN BETEILIGT	100

5.4.3	HYPOTHESEN ZUR FUNKTION VON CD9 BEI DER CDV-INDUZIERTEN ZELL-ZELL-FUSION	102
5.5	DIE CDV-LABORSTÄMME UNTERSCHIEDEN SICH IN IHREN ZYTOPHATISCHEN EFFEKTEN-URSACHEN FÜR DIE UNTERSCHIEDE ZWISCHEN SI- UND NSI-CDV-STÄMMEN	104
6. ZUSAMMENFASSUNG		110
7. LITERATURVERZEICHNIS		114
8. ABKÜRZUNGEN		128
9. LEBENSLAUF		130
10. VERÖFFENTLICHUNGEN		131

1. Einleitung

1.1 Epidemiologie und Pathogenese der CDV-Infektion

Das Hundestaupevirus (CDV) ist ein hochansteckendes virales Pathogen, welches eine oft tödlich verlaufende systemische Erkrankung bei Hunden und anderen Carnivoren verursacht. In Europa wurden erstmals 1761 in Spanien Fälle von Hundestaupe beschrieben. Noch innerhalb des selben Jahrhunderts breitete sich die Staupe auf alle europäischen Länder aus. Bereits 1905 wurde dann von Carre festgestellt, dass es sich bei der Hundestaupe um eine Viruserkrankung handelt. Für die Tiermedizin ist CDV wegen seines breiten Wirtstropismus von besonderer Bedeutung. CDV kann unter natürlichen Bedingungen eine Vielzahl landlebender und im Wasser lebender Carnivoren infizieren (Mamaev et al., 1995,1996), wobei die Mortalitätsrate in Abhängigkeit von der Wirtsspezies bei über 80% liegen kann. So kam es 1980 aufgrund einer CDV-Epidemie beinahe zur Ausrottung des Schwarzfußbills (*Mustela nigripes*) (Williams et al., 1988). Seit 1988 gibt es zudem Anzeichen für eine weitere Expansion des bis dahin schon breiten natürlichen Wirtsspektrums von CDV. Klinisch offenkundige Infektionen mit CDV-ähnlichen Morbilliviren wurden für japanische Primaten (*Macaca fuscata*), Pekaris (*Tayassu tajacu*) und Seehunde des Baikalsees (*Phoca sibirica*) beschrieben (Appel et al., 1991, Visser et al., 1990). Weiterhin wurden erstmals auch von CDV-Varianten verursachte Staupeerkrankungen bei in nordamerikanischen Zoos und Safariparks gehaltenen Löwen, Tigern und Jaguaren beobachtet. 1994 töteten auf CDV zurückzuführende Seuchen 30% der freilebenden Löwenpopulation und eine unbekannte Anzahl von Hyänen im Serengeti Nationalpark (Tanzania) und den benachbarten Gebieten (Harder et al., 1995, Morell, 1994). Hauskatzen sind zwar experimentell mit CDV infizierbar, zeigen aber keinerlei klinische Symptome.

Auch für verschiedene humane Erkrankungen, wie multiple Sklerose und Morbus Paget, wurde CDV als ätiologisches Agens diskutiert. Ein eindeutiger Nachweis der Humanpathogenität des CDV konnte bis heute allerdings nicht erbracht werden (Ooi et al., 2000, Mee et al., 1998, Cosby et al., 1989, Gordon et al., 1993).

CDV ist ein hochkontagiöses Virus, das durch Aerosole oder Tröpfcheninfektion übertragen wird. Charakteristische Symptome der Hundestaupe sind Fieber, Coryza, Konjunktivitis, Pneumonie und Gastroenteritis. CDV gelangt über die Atemwege in den Körper und führt initial zu einer Infektion der Epithelzellen des respiratorischen Trakts. Von dort breitet sich CDV auf die bronchialen Lymphknoten und die Mandeln aus. Innerhalb der ersten Woche nach der Infektion folgt eine Blutzell-assoziierte Virämie mit einer schnellen Verbreitung des Virus im Körper, wobei verschiedene Organe wie die Milz, das Knochenmark, der Thymus und weitere Lymphknoten infiziert werden (Appel und Gillespie, 1972). Durch Infektion von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (Axthelm und Krakowa, 1987) oder durch Transport in infizierten Monozyten (Appel 1969) erreicht das Virus das ZNS. In den meisten Fällen

lässt sich bei erkrankten Hunden CDV auch im Gehirn nachweisen, womit CDV deutlich neurotroper ist als das Masernvirus. Die Infektion des ZNS ist der Grund dafür, dass eine Enzephalomyelitis die häufigste Todesursache bei an CDV erkrankten Hunden ist. Das natürliche Krankheitsbild der Hundestaupe kann in drei Formen auftreten: Als systemische Infektion, als kombinierte systemische und zentralnervöse Form und als überwiegend zentralnervöse Form. Bei immunisierten oder älteren Hunden tritt ein Krankheitsbild auf, das als „old dog encephalitis“ (ODE) oder subakute diffuse sklerosierende Enzephalomyelitis bekannt ist und ebenfalls auf einer CDV-Infektion des ZNS beruht (van Bogaet und Innes, 1962). Die Enzephalomyelitis geht einher mit mononukleären Zellinfiltraten, Einschlußkörperchen in Gliazellen und Neuronen und Demyelinisierung. Sie ähnelt damit der durch Masern verursachten subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE).

Neben dem Neurotropismus zeigt CDV auch einen ausgeprägten Lymphotropismus. CDV ist deshalb wie auch Masern mit einer Lymphopenie und länger anhaltenden Immunsuppression assoziiert, deren molekulare Grundlagen aber noch nicht vollständig bekannt sind. Ein großer Teil der Morbidität und Mortalität von CDV wird durch opportunistische Infektionen verursacht (Ceruti-Sola et al., 1983, Krakowa et al., 1980, ter Meulen et al., 1982).

Hunde, die eine virulente CDV-Infektion überleben, haben normalerweise eine langanhaltende Immunität. Es ist jedoch bekannt, dass alte Hunde gelegentlich trotz lange zurückliegender Impfung wieder empfänglich für CDV-Infektionen werden können. Seit Anfang der 50er Jahre sind Lebendimpfstoffe für CDV erhältlich, welche auf CDV-Stämmen basieren, die durch serielle Passagierung in Zellkulturen attenuiert wurden. Die weite Anwendung dieser Impfstoffe führte gerade in den Industrieländern zu einer drastischen Reduzierung von Staupe-Epidemien. Allerdings wird seit den späten 80er Jahren ein Anstieg der Hundestaupe in Hundepopulationen mit hoher Durchimpfungsrate beobachtet, der von 1991-1995 in größeren Epizoonosen in Frankreich, Japan, Deutschland und Skandinavien gipfelte (Blixenkron-Möller et al., 1993, Gemma et al., 1996). Es wird angenommen, dass ein möglicher Faktor für das Wiederauftreten der Hundestaupe eine antigenische Drift im zur Zeit zirkulierenden Wild-Typ CDV ist (Harder und Osterhaus, 1997).

Hunde, die 8 Tage nach Infektion hohe Titer neutralisierender Antikörper gegen CDV entwickeln (ca. 50% der Hunde), überstehen die Infektion problemlos, während Hunde ohne eine ausreichende Produktion an schützenden Antikörpern eine verbreitete Virämie mit massiver Infektion des ZNS entwickeln und nach 3-4 Wochen versterben (Appel und Gillespie, 1972). Manchmal überleben Hunde auch trotz nicht ausreichender Antikörperantwort, was zur Persistenz von CDV in epidermalen Zellen oder Neuronen führen kann. Diese Viruspersistenz in Zellen der Pfotenballen oder des Gehirns sind die Ursachen für die sogenannte „hard pad disease“, bzw. ODE.

1.2 Biologie des Hundestaupavirus

1.2.1 Taxonomie

Das Hundestaupavirus enthält eine einzelsträngige RNA negativer Polarität und gehört zur Familie der Paramyxoviren und hier in den Genus Morbilliviren. Aufgrund von Sequenzhomologien der viralen Nukleinsäuren und Proteine konnten dieser Gruppe von Viren bisher folgende Mitglieder zugeordnet werden: Das CDV, das Masernvirus (MV), das Rinderpestvirus (RPV), das Peste des petits ruminants Virus (PPRV), das Seehundestaupavirus (PDV-1 und PDV-2) und das Delphin und Tümmler Morbilli Virus. In den letzten Jahren wurden weitere Morbilliviren beschrieben, so z.B. 1998 in Tupajas und Walen (Tidona et al. 1998; Jauniaux et al 1998). Die Morbilliviren wurden ursprünglich von den anderen Genera der Unterfamilie Paramyxoviridae aufgrund des Fehlens einer Neuraminidaseaktivität abgetrennt. Inzwischen wurden allerdings aufgrund von dreidimensionalen Strukturmodellen von Morbillivirus Hämagglutinin-Proteinen auch Neuraminidaseaktivität für diese Proteine vorgeschlagen. Diese Vorhersagen konnte unter speziellen Bedingungen experimentell für das Rinderpestvirus und das Peste des petits ruminants Virus bestätigt werden (Langendijk et al. 1997).

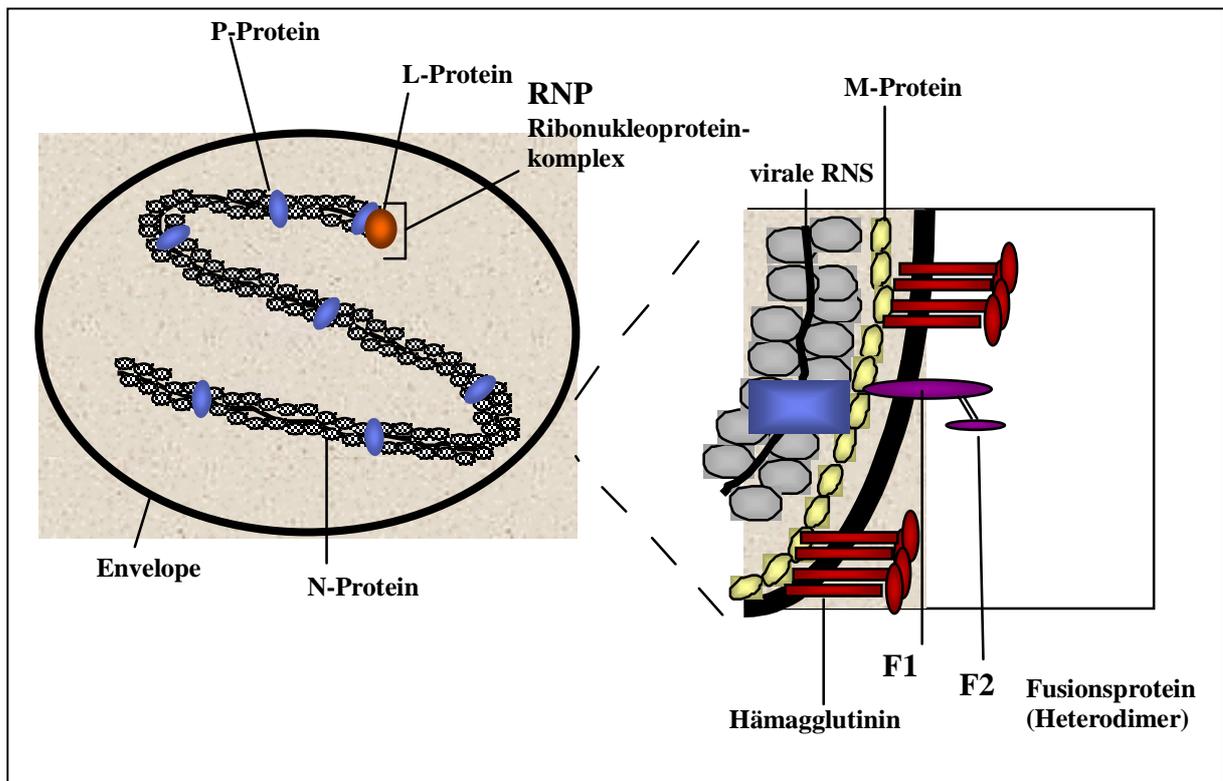


Abb. 1.1: Schematischer Aufbau eines CDV-Partikels.

1.2.2 Morphologie

CDV ist eng mit dem Masernvirus verwandt, was sich in einer großen Ähnlichkeit der Struktur und des Genoms widerspiegelt. CDV-Virionen sind 200-300 nm lange, pleomorphe Partikel und haben einen Durchmesser von etwa 50-100 nm. Wie Abbildung 1.1 zeigt, besteht das CDV-Virion aus einem Ribonukleoprotein-Komplex (RNP), welcher von der viralen Lipidhülle (Envelope) umgeben ist. In der Envelope, welche der Zytoplasmamembran der infizierten Zelle entstammt, sind mit dem Hämagglutinin (H) und Fusionsprotein (F) zwei virale Glykoproteine inseriert, deren Multimere ca. 9-15 nm aus der Membran herausragen. Auf der Innenseite der viralen Hülle befindet sich das Matrixprotein (M), das als Bindeglied zwischen der viralen Hülle und dem Ribonukleoprotein-Komplex dient. Der RNP ist eine replikationskompetente Einheit und setzt sich zusammen aus dem helikal angeordneten, einzelsträngigen RNA-Genom negativer Polarität, das umgeben ist vom Nukleokapsidprotein, dem Phosphoprotein und dem Large-Protein (L), der RNA-abhängigen RNA-Polymerase.

1.2.3 Genomaufbau

Das Genom des Hundestaubevirus ist nicht segmentiert und hat eine Länge von ca. 15900 Basenpaaren. Am 3'-Ende des Genoms befindet sich eine als Leader bezeichnete Sequenzfolge von 52-54 Basen, die nicht für Aminosäuren kodiert. Am 5'-Ende befindet sich ein als Trailer bezeichneter, nichttranskribierter Bereich, in dem die cis-aktiven Initiations-signale für den Start der Synthese neuer Genomstränge während der Virusreplikation liegen. Der Leadersequenz folgen die sechs nicht überlappenden viralen Strukturgene in der Reihenfolge 3'-N-P-M-F-H-L-5' (Abb. 1.2). Durch Verschiebung des Leserasters können innerhalb des P-Genes noch zwei weitere nichtstrukturelle Proteine, C und V, exprimiert werden, wobei die Funktion dieser beiden Proteine noch weitestgehend unbekannt ist. Die Leadersequenz dient der Anlagerung des Polymerasekomplexes und damit der Initiation der Transkription. Die Polymerase rückt daraufhin weiter bis zum Beginn des N-Gens und kann mit der Polymerisation beginnen. Zwischen den proteinkodierenden Sequenzen befinden sich jeweils kurze intergenische Sequenzen, die nicht für Proteine kodieren. Das Überspringen dieser intergenischen Sequenzen und erneuter Transkriptionsstart führt zu 6 verschiedenen mRNAs, die „gecappt“ und polyadenyliert werden. Andererseits kann an den intergenischen Sequenzen auch der Polymerase-Komplex von der Matrize abfallen, wodurch es zum Abbruch der Transkription kommt. Je weiter ein Protein vom 3'-Ende entfernt ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer verfrühten Termination. Es entsteht dadurch ein Transkriptionsgradient (Abb. 1.2) von 3' nach 5', was nach Translation zu einer großen Menge des strukturell benötigten N-Proteins (zur Enkapsidierung des Genoms) und einer sehr geringen Menge des L-Proteins führt (Cattaneo et al., 1987; Schneider-Schaulies et al., 1990, Review: Harder und Osterhaus, 1997).

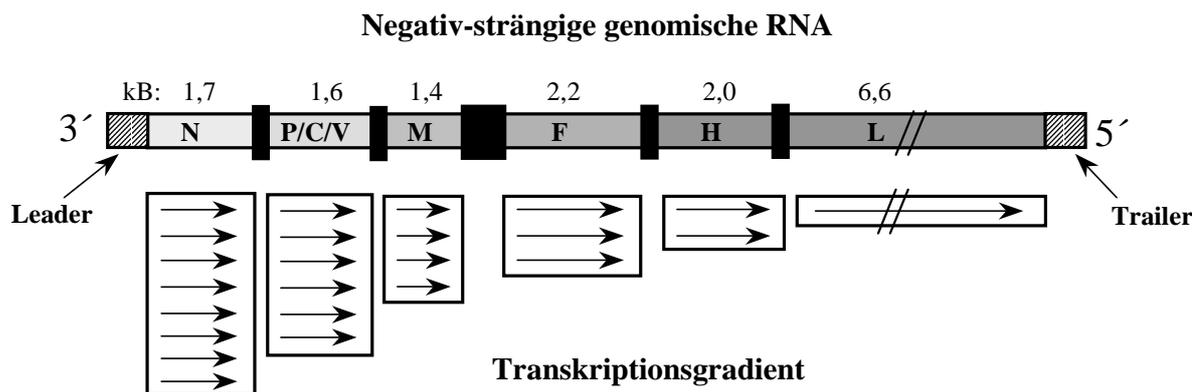


Abb. 1.2: Schematische Darstellung Genoms und der Transkriptionsstrategie des CDV. Das CDV-Genom beginnt mit einer Leadersequenz am 3'-Ende und endet mit einer Trailersequenz am 5'-Ende (gestrichelte Kästchen). Zwischen den Genen für die Strukturproteine (grau) liegen die intergenischen Regionen (schwarze Balken) an denen es zur Termination der Transkription kommen kann. Die Pfeile geben den Transkriptionsgradienten wieder.

1.2.4 Funktion der viralen Proteine

Das phosphorylierte **Nukleoprotein** (N) ist ein wichtiger Bestandteil des Nucleocapsids und stellt quantitativ den Hauptbestandteil eines CDV-Virions dar. Es hat ein Molekulargewicht von ca. 60 kDa und lagert sich über seinen aminoterminalen Bereich an die genomische RNA an. Aufgrund dieser Verpackung durch das Nukleoprotein ist die virale RNA vor dem Verdau durch intrazelluläre Nukleasen geschützt. Über die carboxyterminalen Domäne interagiert das N-Protein mit den Proteinen P und L. Das N-Protein selbst zeigt keine enzymatische Aktivität, ist aber obligat für die Transkription und trägt über Wechselwirkungen mit dem M-Protein zu einer korrekten Faltung und Verpackung der Nucleokapside in neue Viruspartikel bei.

Beim **Phosphoprotein** (P, 73 kDa) handelt es sich um ein phosphoryliertes, wahrscheinlich trimeres Polypeptid. Als „mobiles“ Protein kann es seine Position auf der RNA während des Transkriptionsprozesses verändern. Als klassischer Transaktivator reguliert das P-Protein außerdem die Funktionen des L-Proteins.

Das **Matrixprotein** (M, 35 kDa) lagert sich aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften als Matrixschicht auf der Innenseite der Zytoplasmamembran an. Es interagiert einerseits mit den beiden viralen Glykoproteinen H und F, ist aber andererseits auch mit dem N-Protein über ionische Wechselwirkungen verbunden. Das Matrixprotein sorgt so für eine Verknüpfung von RNP-Komplex und dem zukünftigen viralen Envelope. Diese Verbindung spielt eine zentrale Rolle für das Virus-Assembly und die Knospung (Budding) neuer Viruspartikel (Abb. 1.3). Deshalb wird auch vermutet, dass die Etablierung persistenter CDV-Infektionen auf Mutationen im Matrixprotein zurückzuführen sind (Stettler et al., 1997).

Das **Fusionsprotein** (F) hat die Funktion, die Verschmelzung des viralen Envelope mit der Zytoplasmamembran der Zielzelle zu bewerkstelligen. Es wird als Typ I Transmembranprotein (TM) in Form des inaktiven Vorläuferproteins F_0 (59 kDa) im ER synthetisiert und glykosyliert. Durch Endoproteasen (hauptsächlich Furin) wird das F_0 -Protein im Golgi-Apparat in die zwei funktionellen Untereinheiten F_1 (40 kDa) und F_2 (19 kDa) gespalten. Sie bleiben über eine Disulfidbrücke als Heterodimer verbunden, welches mit anderen F-Proteinen als Trimere in die Zytoplasmamembran eingelagert wird. Das Fusionsprotein ist über das C-terminale Ende der F_1 -Untereinheiten in der Membran verankert, während durch die Spaltung am N-terminalen Ende des F_1 eine hochkonservierte Region aus hydrophoben Aminosäuren (AS), das sogenannte Fusionspeptid, freigelegt wird. Das F_2 -Protein hingegen enthält vier N-Glykosylierungsstellen, die für die Reifung und Funktion des Proteins notwendig sind. Die Fusion der viralen Hülle mit der Zellmembran erfolgt pH-unabhängig und ermöglicht den direkten Eintritt des CDV in das Zytoplasma der Zielzelle. Die Fusion von Zellmembranen benachbarter, infizierter Zellen sorgt durch die Bildung von Synzytien für den typischen zytopathischen Effekt (CPE) mancher CDV-Stämme in Zellkultur.

Das **Hämagglutinin** (H, 77 kDa) ist ein Typ II-TM, das im ER synthetisiert wird, wo auch im Laufe der Reifung zwei Moleküle durch Disulfidbrücken zu Dimeren verbunden werden. Diese werden zum Golgi-Apparat transportiert, wo es zur Modifizierung der Zuckergruppen an den vermuteten 6 N-Glykosylierungsstellen kommt. An der Zelloberfläche erscheint das Hämagglutinin als Tetramer (Malvoisin und Wild, 1993). Die Funktion des Hämagglutinins ist die Rezeptorbindung, d.h. die Bindung des Virus an entsprechende Zielzellen. Es ist somit die Hauptdeterminante für die Wirts- und Zelltypspezifität des CDV. Expressionsversuche im Vakzinia-System haben zudem gezeigt, daß es nur bei einer Doppelexpression von H und F zu einer effizienten Fusion kommt, was neben der Bindungsfunktion eine Fusionshelfer-Aktivität des Hämagglutinins belegt (Stern et al., 1994). Ursprünglich wurde das Masern-Hämagglutinin nach seiner Fähigkeit, Affenerythrozyten zu agglutinieren, benannt. Im Gegensatz zu andern Morbilliviren, wie z.B. dem Masernvirus, konnte für das CDV-H-Protein keine hämagglutinierende Wirkung gezeigt werden (Appel und Gillespie, 1972).

Das **Large-Protein** (L, 180 kDa) ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die aber nur im Komplex mit den Proteinen P und N wirken kann. Es ist nicht gleichmäßig über das Nucleocapsid verteilt, sondern tritt gehäuft an den transkriptionsaktiven Stellen der genomischen RNA auf. Das L-Protein ist wahrscheinlich zudem als Kinase an der Phosphorylierung der P- und N-Proteine beteiligt. Der Komplex aus L- und P-Protein ist sowohl während der Transkription als auch während der Replikation aktiv. Zu seinen Funktionen gehören neben der Initiation, Elongation und Termination der RNA-Synthese auch das Capping und die Methylierung der 5'-Enden sowie die 3'-Polyadenylierung der mRNA.

1.2.5 Replikation des Hundestaupevirus

Der erste Schritt in der Replikation ist die Anheftung des H-Proteins an den zellulären Rezeptor, wodurch Virus- und Zellmembran in räumliche Nähe gebracht werden. Danach kommt es zu Konformationsänderungen des F-Proteins, wodurch es sich mit dem hydrophoben Fusionspeptid in der Zellmembran verankert und über weitere Konformationsänderungen eine Fusion zwischen Virushülle und Zellmembran herbeiführt (siehe auch 5.3). Das Nukleocapsid mit der negativsträngigen RNA kann dadurch in das Zytoplasma entlassen werden („uncoating“), wo sofort die Transkription viraler mRNA beginnt (Abb. 1.3 A). Die Umschaltung von der Transkription subgenomischer mRNAs zur Replikation des CDV-Genoms wird durch die Verfügbarkeit des N-Proteins gesteuert (Blumberg et al., 1981). Voraussetzung für die Bildung eines neuen Virusgenoms ist die Synthese durchgehender RNA-Moleküle in Positivstrangorientierung, d.h. die Synthese dieser RNA darf an den intergenischen Regionen nicht abbrechen. Ist eine ausreichende Menge des N-Proteins vorhanden, interagiert dieses mit der Leader-RNA und bewirkt dadurch eine Antitermination an den Stop-Sequenzen der Proteine. Unterstützt wird die Antitermination zudem durch eine Komplexbildung der N und P-Proteine, die durch Wechselwirkungen mit dem L-Protein die Entstehung des Antigenoms fördert. Ausgehend von der 5'-gelegenen Trailer-Region wird dann die negativ-strängige genomische RNA generiert.

Die neusynthetisierten viralen Hüllproteine H und F werden in die Membran der infizierten Zelle inseriert und gehen Wechselwirkungen mit dem Matrixprotein ein, wodurch dieses an der Innenseite der Zytoplasmamembran eine Matrixschicht ausbildet. Diese interagiert wiederum mit dem Ribonukleinkomplex und es kommt zur Freisetzung neuer Viruspartikel durch Knospung (Abb. 1.3 B) oder Lyse der Zelle.

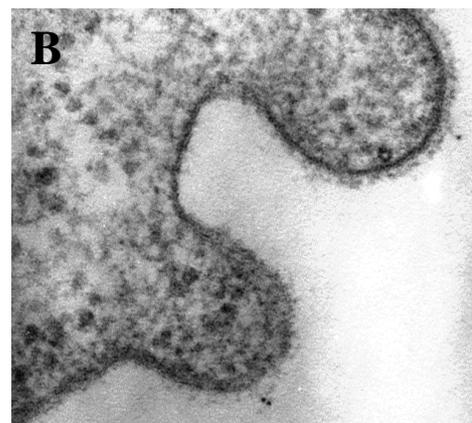
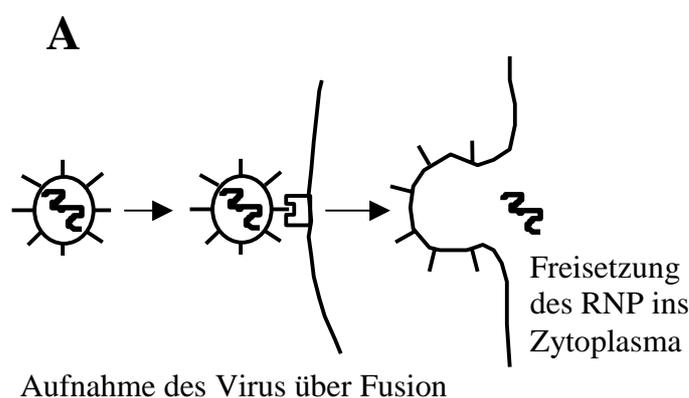


Abb. 1.3: Schema der Virusaufnahme durch Fusion und Detail einer Virusknospung von der Zelloberfläche einer infizierten Zelle.

1.3 CDV-Genotypen und Charakterisierung der CDV Impfstämme

Serologisch wird CDV, wie MV und RPV, als monotypisches Virus betrachtet und klassische Methoden wie die Immunfluoreszenz-Färbung mit polyklonalen Antikörpern zeigen keine unterschiedlichen Serotypen innerhalb der verschiedenen CDV-Stämme. Nichtsdestoweniger können durch Kreuz-Neutralisations- und kinetische Neutralisations-Assays CDV-Vakzine und Wildtypen unterschieden werden (Harder et al., 1993, 1996). Es konnte gezeigt werden, dass Seren von Tieren, die mit Wild-Stämmen infiziert wurden, Neutralisationstiter gegen das homologe Virus aufweisen, die um das 10fache höher sind als die, die gegen Vakzine-Stämme von CDV produziert werden (Harder et al., 1996).

Es gibt aber noch keinen Hinweis darauf, dass die Veränderungen in den heutigen virulenten CDV-Stämmen die Effizienz der gebräuchlichen Vakzine beeinträchtigen, zumal eine heterotypische Vakzinierung mit MV-Proteinen Hunde zumindest partiell vor einer Infektion mit virulentem CDV schützt (Obeid et al., 1995).

Für phylogenetische Untersuchungen verschiedener CDV-Stämme zeigte sich ein 388-bp großes Fragment des P-Genes sehr informativ, das mit sogenannten „Universalen Morbillivirus Primern“ mittels PCR bei jedem Morbillivirus nachgewiesen werden kann. Phylogenetische Analysen dieses P-Fragments ergeben, dass die verschiedenen CDV-Stämme in Gruppen nach der geographischen Herkunft eingeteilt werden müssen und nicht in Gruppen in Abhängigkeit von der Wirtsspezies (Abb. 1.4 A). Ein noch genaueres Bild der phylogenetischen Beziehungen innerhalb der CDV-Stämme liefert die Analyse der Sequenz des H-Proteins (Abb. 1.4 B). Die Gruppen, die sich aus der Verwandtschaftsanalyse der H- und P-Gene ergeben, sind sehr ähnlich, was Rekombinationsereignisse zwischen den einzelnen Linien unwahrscheinlich macht. Nach neusten Ergebnissen können 5-6 separate Gruppen von CDV Wild-Stämmen unterschieden werden, die sich um mehr als 0,5% auf Basis der Nucleotidsequenz unterscheiden. In Anlehnung an die Definition, die für die Analyse von Variationen der Masern-Stämme verwendet wird, bezeichnet man diese Gruppen als Genotypen. Die CDV Impfstämme bilden dabei einen eigenen Genotyp, der sich zum Teil deutlich von den geographisch determinierten Wild-Stamm Genotypen unterscheidet. Der größte Unterschied ist auf der Aminosäure-Ebene mit 10,2% zwischen dem H-Protein des Onderstepoort Impfstammes und dem Wildtyp-Isolat aus einem Chinaleoparden zu finden. Die Sequenz des H-Genes zeigt auch, dass zwischen neuen japanischen Hunde-Isolaten eine 99%ige Identität besteht, die Japan-Isolate zu 95% mit europäischen und amerikanischen Isolaten verschiedenster Spezies und zu 90% mit Impfstämmen identisch sind (Iwatsuki et al., 1997). Zudem besitzen CDV Wild-Isolate im Vergleich zum Impfstamm Onderstepoort bis zu vier zusätzliche N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne des H-Proteins.

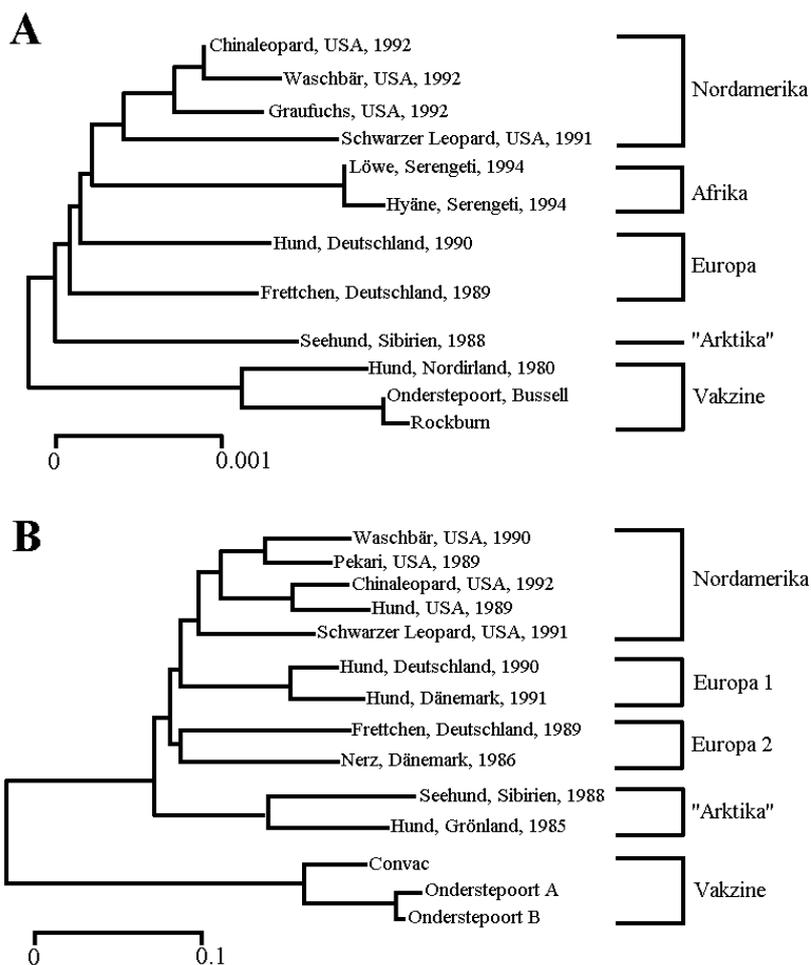


Abb. 1.4: Phylogenetische Verwandtschaft zwischen CDV Wild-Isolaten und Vakzine-Stämmen. (A) gibt die geographisch Einteilung der Genotypen nach Analyse des 388-bp Fragments des N-Genes wieder, während (B) die Verwandtschaft auf Grundlage eines Sequenzvergleichs des kompletten H-Genes wiedergibt. Die genetische Divergenz (siehe Skala für die Größenordnung) wurde nach Kimura's 2-Parameter-Methode berechnet. Zu den Isolaten ist jeweils die Wirtsspezies, das Ursprungsland und das Jahr der Isolierung angegeben (Abbildung nach Harder und Osterhaus, 1997).

Die im Rahmen dieser Dissertation zum Einsatz kommenden CDV-Stämme sind zum großen Teil Impfstämme. Einer der wichtigsten Laborstämme ist dabei der Onderstepoort-Stamm, der weltweit als attenuierte Lebend-Vakzine verwendet wird. Er geht zurück auf ein Isolat, das während einer Epidemie unter Füchsen in amerikanischen Zuchtfarmen um 1930 gewonnen wurde und das dann über einen längeren Zeitraum in Frettchen passagiert wurde. In den 40-50er Jahren wurde das Virus dann auf Hühnereier adaptiert und in diesem System viele Male weiterpassagiert. Nach diesen Passagierungen wurde das attenuierte Virus als Onderstepoort bezeichnet und aufgrund seiner kompletten Apathogenität im Tiermodell ab 1960 als Lebend-Vakzine eingesetzt (Haig, 1948, Appel und Gillespie, 1972). Der Onderstepoort-Stamm kann viele verschiedene Zelllinien, wie z.B. Vero und HeLa, infizieren und führt in den meisten Fällen zu einer zytolytischen Infektion mit ausgeprägter Synzytienbildung. Die Stämme Onderstepoort „Small Plaque“ (OND-SP) und Onderstepoort „Large Plaque“ (OND-LP) sind, wie der Stamm Bussell (Bussell und Karzon, 1965), an Vero-Zellen adaptierte Klone des

Onderstepoort Impfstammes. Sie zeigen kaum Abweichungen auf genomischer Ebene und unterscheiden sich im wesentlichen in der Größe der von ihnen in Zellkultur gebildeten Synzytien. Der Stamm A75/17-V induziert in den meisten infizierten Zellkulturen ebenfalls die Bildung von Synzytien, geht aber ursprünglich auf den virulenten Wild-Stamm A75/17 zurück, der ausgehend von infiziertem Lymphgewebe über 17 Blindpassagierungen an Vero-Zellen adaptiert wurde (Hamburger et al., 1991). A75/17-V kann im Hunde-Modell zwar ebenfalls keine Erkrankung mehr verursachen, etabliert aber in primären Hirnzellen wie der Wild-Stamm eine nicht-zytolytische, persistente Infektion.

Der Impfstamm Rockburn induziert in der Zellkultur im Gegensatz zu den Onderstepoort-Varianten keine Synzytienbildung, obwohl er wie Onderstepoort auf ein Isolat aus einem erkrankten Tier zurückgeht. Anders als Onderstepoort wurde Rockburn aber durch wiederholte Passagierung in Hunde-Nierenzellkulturen (MDCK) attenuiert. Rockburn besitzt eine Restvirulenz, die u.U. eine postvakzinale Enzephalitis verursachen kann und revertiert nach wenigen Passagen in primären Hundmakrophagen zur vollständigen Virulenz (Appel, 1978). Über den Stamm Dog/NI ist nur bekannt, dass sein Ursprung ein Vero-adaptiertes Isolat eines Hundestaupiefalls in Nordirland ist und er in infizierten Vero-Zellen keine Synzytienbildung induziert. Der Stamm HAN2245/95 geht auf ein Isolat aus einem an Staupe erkrankten Hund aus Deutschland zurück, das fünf mal in Vero-Zellen passagiert wurde (Haas et al., 1999).

1.4 Allgemeines über Virusrezeptoren

Der Beginn einer jeden Virusinfektion ist die Bindung des Virus an einen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche. Dieser erste Schritt des Infektionszyklus stellt ein günstiges Ziel dar für antivirale Agenzien und Impfstoffe, weshalb die Ermittlung der Identität viraler Rezeptoren ein Gebiet intensiver virologischer Forschung ist. Virusrezeptoren sind in der Regel Oberflächenmoleküle mit spezifischen Funktionen für den Organismus, an die sich das Virus evolutiv anpassen konnte (Schneider-Schaulies, 2000).

Bis Mitte der 80er Jahre waren hauptsächlich nur Sialinsäuren als virale Rezeptoren beschrieben, die unter anderem als Rezeptoren für Inflenzaviren und Coronaviren dienen (Herrler et al 1985, Vlasak et al., 1988). Im Laufe der letzten Jahre wurde eine Vielzahl an Oberflächenstrukturen wie Immunglobulin-ähnliche Moleküle (Dalglish et al., 1984; Lusso et al., 1994), Integrine (Bergelson et al., 1992) und Komplementrezeptoren (McClure, 1992; Bergelson et al., 1994; Naniche et al., 1993) als Rezeptoren für Viren identifiziert. Viren verschiedener Familien können auch ein und denselben Rezeptor verwenden, wie z.B. das CD4, welches sowohl für das HIV, als auch für das humane Herpesvirus Typ 7 (HSV-7) als Rezeptor dient (Bhat et al., 1991; Lusso et al., 1994). Das klassische Rezeptorkonzept ging von einem hochspezifischen Rezeptor aus, an den ein Ligand nach dem Schlüssel-Schloß-Prinzip bindet. Mit dem Fortschreiten der Rezeptorforschung wurde deutlich, dass die Bindung von Viren an Zellen selten so schematisch abläuft. Häufig ist schon die Virusbindung ein mehr-

phasiger Prozess und es ist mehr als ein Rezeptor an diesem Vorgang beteiligt. So können Viren neben dem hochaffinen, primären Rezeptor, der häufig das Wirtsspektrum des Virus bestimmt, in Abwesenheit des primären Rezeptors auch an alternative, meist niederaffine Rezeptoren binden. Ein Beispiel dafür ist das humane Immundefizienz-Virus (HIV), das sowohl CD4 als auch CCR5, CXCR4 und Galaktosylceramid als Rezeptoren benutzt. So bindet HIV z.B. in Abwesenheit des Primären Rezeptors bei CD4-negativen Neuronen und Mukosazellen des Dickdarms an das Galaktosylceramid (Harouse et al., 1991; Fantini et al., 1993).

Werden für den erfolgreichen Eintritt des Virus in die Zelle neben primären und alternativen Rezeptoren weitere Faktoren benötigt, so werden diese als Kofaktoren bezeichnet, oder bei nachweislicher Bindung an Hüllproteine des Virus als Korezeptoren. Gerade in den letzten Jahren ist deutlich geworden, daß primäre Rezeptoren, die unmittelbar für die Bindung des Virus benötigt werden, nicht unbedingt für den Eintritt von Viren in Zellen ausreichen. So können z.B. CD4-transfizierte Mauszellen zwar HIV binden, lassen aber keinen Transport des Nukleokapsids in das Zytoplasma zu (Signoret et al., 1993). Die Suche nach den sogenannten Levy-Faktoren als notwendige Voraussetzung zum Eintritt des HIV in humane Zielzellen führte 1996 zur Identifizierung der Chemokinrezeptoren CXCR4 (Fusin-, LESTR-Rezeptor) für T-Zell-trope und CCR5 für makrophagentrope HIV-Stämme (Feng et al., 1996; Dragic et al., 1996). Dabei wird nach Bindung des viralen gp120 an zelluläres CD4 die V3-Schleife des gp120 freigelegt. Dadurch erfolgt die Bindung an die Chemokinrezeptoren, die nach Konformationsänderung des resultierenden ternären Komplexes zur Fusion der HIV-Membran mit der Zielzellmembran führt (Feng et al., 1996). Die Chemokinrezeptoren definieren hierbei als Korezeptoren des CD4 den Zelltropismus von HIV-Isolaten, können jedoch in Abwesenheit des CD4 auch mit niedriger Affinität als alternative Rezeptoren fungieren (Endres et al., 1996; Bandres et al., 1998).

Der komplexe Ablauf der frühen Phase der Infektion wird ebenfalls am Beispiel des Herpes Simplex Virus (HSV) deutlich. Mindestens drei virale Glykoproteine (gB,gD,gH) und mehrere zelluläre Makromoleküle werden in einer Kaskade von Interaktionen für die Aufnahme in das Zytoplasma benötigt (Spear, 1993). Tab. 1-1 gibt eine Übersicht über verschiedene Klassen primärer Rezeptoren, alternativer Rezeptoren und Korezeptoren die für einen Eintritt des Virus in das Zytoplasma benötigt werden.

Der zelluläre Rezeptor des Hundestaupevirus ist zur Zeit noch nicht bekannt. Es wurde aber bei genetischen Untersuchungen mit Human-Maus-Zellhybriden das humane Chromosom identifiziert, das für einen CDV-Rezeptor kodiert (Stern et al., 1995). Dabei bildeten zwei von 12 getesteten hybriden Zelllinien nach Infektion mit CDV Synzytien. Diese beiden Hybride enthielten als einzige neben anderen humanen Chromosomen das Chromosom 19, weshalb angenommen wird, dass es ein Gen für ein CDV-Rezeptorprotein trägt.

Virus	Rezeptor	Korezeptor	Literatur
Immunglobulin-ähnliche Moleküle			
HHV 7 (<i>Herpesviridae</i>)	CD4		Lusso et al., 1994
Masernvirus (<i>Paramyxoviridae</i>)	CD150 (SLAM)		Tatsuo et al., 2000 Erlenhöfer et al. 2001
Poliovirus (<i>Picornaviridae</i>)	Polio Virus Rezeptor, CD44		Mendelsohn et al., 1989 Racianello et al., 1994
Rhinovirus	CD54 = ICAM1		Greve et al., 1981
HIV, SIV (<i>Lentiviridae</i>)	CD4 (CDR2-Schleife des N-term. D1(Ig)-Moduls)	CCR1,CCR4 CCR5,CCR3, CXCR1+2, CXCR4 u.a.	Dalglish et al., 1984 Dragic et al., 1996 Feng et al., 1996 Bandres et al., 1998
Komplement-Rezeptoren			
EBV (<i>Herpesviridae</i>)	CD21 (CR1: SCRs1+2)		McClure, 1992
Masernvirus (<i>Paramyxoviridae</i>)	CD46 (MCP: SCR1+2)	Moesin	Naniche et al., 1993 Dunster et al., 1994
Coxsackievirus B1 (<i>Picornaviridae</i>)	CD55 (DAF)	$\alpha v \beta 6$ (Integrin)	Shafren et al., 1995 Agrez et al., 1997
Echovirus 7	CD55 (DAF: SCRs2-4)		Bergelson et al., 1994
Sonstige			
Vaccinia V. (<i>Poxviridae</i>)	EGF Rezeptor		Marsh/Eppstein 1987
HCV OC43 (<i>Coronaviridae</i>)	Sialinsäure		Vlasak et al., 1988
Dengue Virus (<i>Flaviviridae</i>)	Heparansulfat		Chen et al. 1997
Sindbis (<i>Togaviridae</i>)	Heparansulfat, Laminrezeptor		Byrnes/Griffin 1998
HCMV (<i>Herpesviridae</i>)	Heparansulfat		Compton et al. 1993
HSV (<i>Herpesviridae</i>)	Heparansulfat, TNF/NGF		WuDunn und Spear 1989
Influenza-V. (<i>Orthomyxoviridae</i>)	Sialinsäure		Herrler et al., 1985
Sendai-V. (<i>Paramyxoviridae</i>)	Sialinsäure		Markwell et al., 1981
Tollwut V. (<i>Rhabdoviridae</i>)	Acetylcholinrezeptor		Lentz (1990)
VSV (<i>Rhabdoviridae</i>)	Phosphatidylserin, GM3 Gangliosid, P-inositol		Mastromarino 1987

Tab. 1.1 : Virusrezeptoren

1.5 Das Tetraspanin CD9

1.5.1 Bedeutung von CD9 für die CDV-Infektion

Bei der Suche nach dem CDV-Rezeptor wurden in unserer Arbeitsgruppe Mäuse mit CDV-permissiven Vero-Zellen immunisiert und anschließend mit den isolierten B-Zellen Hybridome erzeugt. Beim Screening der erzeugten Antikörper wurde ein monoklonaler Antikörper K41 gefunden, der in der Lage war, die Infektion von Zellen mit CDV zu hemmen. Auf Zelllinien verschiedener Spezies wurde die Expression des erkannten Moleküls im Durchflußzytometer gemessen und die Infizierbarkeit mit CDV, sowie die Inhibierung der Infektion durch mAK K41 damit verglichen. Es zeigte sich, dass die Expression des K41-Epitopes weitestgehend mit der Infektion und der Hemmbarkeit der CDV-Infektion korrelierte. Bei K41-positiven Zellen von Mensch, Affe, Hund, Katze, Kaninchen und Waschbär konnte durch die Behandlung der Zellen mit dem Antikörper K41 sowohl die Anzahl der durch CDV entstehenden infizierten Zentren, als auch die Größe der entstehenden Synzytien reduziert werden (Löffler et al., 1997; Abb. 1.5). Mittels Affinitätschromatographie mit an Sepharose gekoppeltem mAK K41 wurde ein 26 kDa Protein aus der Vero-Zellmembran gereinigt. Nach der Sequenzierung dieses Proteins ergab eine Durchsichtung von Genbanken, dass es sich dabei um das CD9-Molekül handelt. CD9 ist ein Mitglied der Transmembran-4 Protein-Superfamilie (TM4SF) und ist als integrales Membranprotein auf der Oberfläche vieler Zelllinien zu finden.

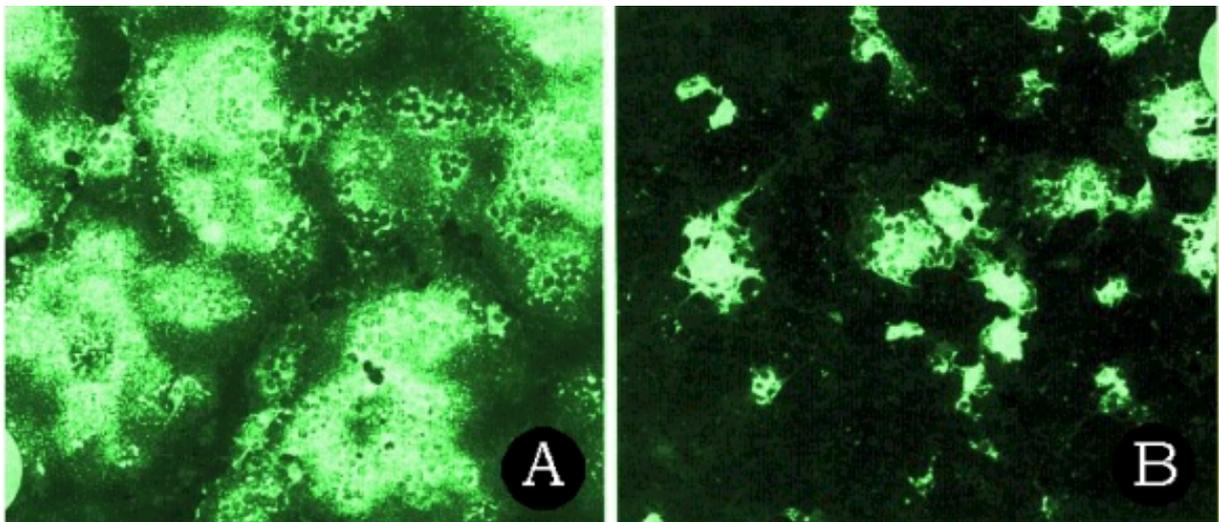


Abb. 1.5: Hemmung der CDV-Infektion von Vero-Zellen durch anti-CD9-Antikörper. Vero-Zellen wurden mit CDV OND-LP (MOI=0,1) infiziert und für 24 Std. ohne (A) und mit mAK K41 gegen CD9 (B) inkubiert. Die Aufnahmen zeigen eine Fluoreszenzfärbung der viralen Proteine mit einem Hunde-Hyperimmuns Serum und einem FITC-markierten Sekundärantikörper. Durch die Fusion infizierter Zellen mit uninfizierten Zellen kommt es zur Bildung von Synzytien

Um zu klären, ob es sich bei CD9 um einen möglichen CDV-Rezeptor handelt, wurden CD9-negative und nur sehr schlecht mit CDV infizierbare MDBK- und NIH-3T3-Zellen mit einem CD9-Expressionsplasmid transfiziert. Die transfizierten Zellen zeigten bei Infektion mit CDV im Vergleich zu Kontrollzellen eine deutliche Zunahme sowohl der Anzahl als auch der Größe der Synzytien. Auch die Produktion neuer CDV-Partikel war um das 10-100fache erhöht. Allerdings konnte mit zwei unabhängigen experimentellen Systemen, i.e. Virus-Overlay-Protein-Bindungs-Assay (VOPBA) und Ko-Immunoprecipitation, keine direkte Bindung von CDV an CD9 nachgewiesen werden. Wenn CD9 also nicht als primärer Rezeptor für CDV dient, kann seine Funktion möglicherweise die eines Korezeptors oder Kofaktors sein.

Der Zusammenhang zwischen CD9 und dem Katzen-Immundefizienzvirus (FIV) suggerierte, dass CD9 im Falle der CDV-Infektion aber auch eine ganz andere Funktion haben könnte. Für FIV wurde das Katzenhomolog von CD9 zuerst ebenfalls als möglicher Rezeptor identifiziert, da die CD9-Expression mit der Infizierbarkeit von Zellen korrelierte, CD9-Antikörper die Infektion inhibierten und durch die ektopische Expression von CD9 Zellen permissiv für FIV wurden (Willet et al., 1994). Interessanterweise stellte sich dann aber heraus, dass Antikörper gegen CD9 die FIV-Infektion in einem Schritt nach der Virusaufnahme hemmen. Dabei bewirken die CD9-Antikörper einen bisher noch nicht beschriebenen Hemm-Mechanismus, der vermutlich den Zusammenbau („Assembly“) und die Virusfreisetzung inhibiert (Parseval et al., 1997; Willet et al., 1997). Eine ähnliche Funktion könnte CD9 auch im Fall von CDV haben.

1.5.2 Struktur und bekannte Funktionen des CD9

Zur TM4 Superfamilie zählen neben CD9 auch CD53, CD63, CD81/TAPA-1 und CD82. Die TM4-Moleküle besitzen alle vier hydrophobe Transmembrandomänen (TM1-TM4), zwei unterschiedlich große extrazelluläre Schleifen (EC1 und EC2) und neben den im Zytoplasma lokalisierten Amino- und Carboxy-Enden ein weiteres zytoplasmatisches Segment. Beim 20-24 kDa großen CD9 enthält die kleinere extrazelluläre Schleife (EC1) eine Glykosylierungsstelle (Abb. 1.6). Die TM4-Moleküle weisen untereinander eine signifikante Sequenzhomologie auf, z.B. zwischen CD9 und CD81/TAPA-1 eine 45%ige Identität, die nahelegt, dass die Proteine gleiche oder ähnliche Funktionen ausüben.

Eines der Hauptmerkmale der Tetraspanine ist ihre physikalische Assoziation untereinander und mit Mitgliedern der Integrinfamilie, mit MHC Klasse II Glykoproteinen, CD2, CD4 und CD8. Für CD9 wurde im Speziellen eine Assoziation mit β_1 -Integrinen, Calnexin, den TM4-Molekülen CD63, CD81 und CD82, sowie dem 25kDa G-Protein gezeigt (Rubinstein et al., 1997).

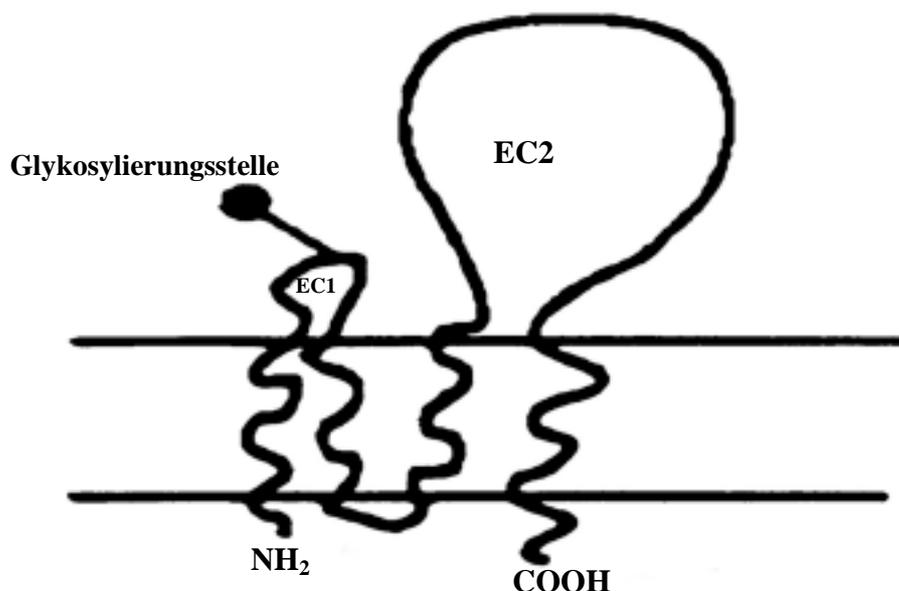


Abb. 1.6: Schematische Struktur des CD9-Moleküls

CD9 ist an einer Vielzahl zellulärer Funktionen beteiligt, wie der Aktivierung, Adhäsion und Motilität von Zellen, der Zelldifferenzierung und an Zell-Zell-Interaktionen. So sind Antikörper gegen CD9 in der Lage Blutplättchen zu aktivieren und deren Aggregation zu stimulieren (Carroll et al., 1990, Jennings et al., 1990). Die Aggregation wird dabei durch die Interaktion von CD9 mit Integrinen vermittelt (Slupsky et al., 1989). CD9 kann auch einen Komplex mit dem Diphtherie-Toxin-Rezeptor (DTR) bilden, wodurch die Anzahl der Bindungsstellen pro Zelle und die Affinität des DTR erhöht wird und sich die Sensitivität von Zellen gegenüber dem Diphtherie-Toxin um ca. das Zwanzigfache erhöht (Brown et al., 1993, Iwamoto et al., 1994). Auf T-Zellen der Maus dient CD9 als kostimulatorisches Molekül und CD9-Antikörper führen synergistisch mit CD3-Antikörpern zur Proliferation nicht vorstimulierter T-Zellen (Tai et al., 1996). Daneben beeinflusst CD9 die Adhäsion und Beweglichkeit von B-Zellen und Schwannschen Zellen (Shaw et al., 1995, Anton et al., 1995). Erst kürzlich wurde entdeckt, dass bei Mäusen CD9 essentiell für die Fusion von Spermium und Eizelle ist, wobei aber die genaue Funktion des CD9 bei diesem Vorgang noch nicht geklärt ist (Miller et al., 2000). Neben CD81 fördert und unterstützt CD9 auch Differenzierung und Fusion von Muskelzellen (Tachibana und Hemler, 1999).

Untersuchungen von Signaltransduktionswegen führten zu der Beobachtung, dass über CD9 eine Reihe verschiedener Signalübertragungs-Mechanismen ausgelöst werden. So ist CD9 mit GTP-bindenden Proteinen assoziiert (Seehafer und Shaw, 1991), bestimmte Antikörper gegen CD9 aktivieren Tyrosin-Kinasen (Ozaki et al., 1995), induzieren intrazelluläre Ca^{2+} -Freisetzung und den Ca^{2+} -Einstrom (Yatomi et al., 1990, Hato et al., 1990). CD9-Antikörper erhöhen die Arachidonsäure-Konzentration in Blutplättchen (Ozaki et al., 1990) und beeinflussen die Phosphatidylinositolphosphat-Spaltung (Yatomi et al., 1993). Auch an der Modulation von Integrin-Signalen ist das CD9 beteiligt (Berditchevski und Odintsova, 1999).

Von seinen Funktion her handelt es sich bei CD9 also um ein sehr vielseitiges Molekül mit einem breiten Wirkungs-Spektrum.

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war aufzuklären, welcher Mechanismus der durch anti-CD9-Antikörper vermittelten Hemmung der CDV-Infektion zugrunde liegt, und somit die Bedeutung von CD9 für die CDV-Infektion näher zu bestimmen.

Zunächst war zu klären, ob CD9 eventuell als Rezeptor oder Korezeptor an der Bindung von CDV an Zellen und der anschließenden Virusaufnahme beteiligt ist. Ausgehend von dem sich ergebenden Befund, dass Antikörper gegen CD9 die CDV-Infektion in einem Schritt nach der Virusaufnahme hemmen, sollte dann die Art des Hemmmechanismus entschlüsselt werden. Dazu wurde untersucht, in welchem Maße CD9-Antikörper einen Effekt auf die verschiedenen Prozesse der Virusreplikation haben, wie z.B. die virale RNA- und Proteinsynthese oder die viral induzierte Zellfusion.

Zwischen den CDV-Wild- und Impfstämmen, aber auch zwischen den unterschiedlichen Impfstämmen, gibt es deutliche Unterschiede in der Sequenz der viralen Proteine und dem von ihnen bewirkten zytopathischen Effekt. Es sollte deshalb geklärt werden, ob sich verschiedene CDV-Stämmen hinsichtlich ihrer Hemmbarkeit mit mAK K41 unterscheiden. Zudem sollten ihr Bindungstropismus an verschiedene Zelllinien, sowie ihre Fähigkeit, eine Proliferationshemmung bei Lymphozythen zu induzieren, verglichen werden.

Mit FRP-1 und FRP-2 sind seit einigen Jahren zelluläre Moleküle bekannt, die abhängig vom Virus-Zellsystem die viral induzierte Zell-Zell-Fusion sowohl hemmen als auch stimulieren können. Sowohl CD9 als auch FRP-1 sind funktionell mit Integrinen assoziiert, weshalb mechanistische Zusammenhänge oder ähnliche Regulationsmechanismen zwischen CD9- und FRP-regulierten Zellfusionen bestehen könnten. Es sollte deshalb untersucht werden, ob die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion in gleicher Weise mit FRP-1- oder CD9-Antikörpern gehemmt werden kann, oder ob sich die beiden Antikörper gegenseitig in ihrer regulativen Wirkung beeinflussen können.

Es sollte außerdem getestet werden, inwiefern durch RGD-Peptide, die als Liganden die Bindungsaktivität bestimmter Integrine beeinflussen können, ein Effekt auf die CDV-induzierte Zellfusion zu erzielen ist.

2. Material

2.1 Zellen

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
Vero	Fibroblast (Niere)	afrikan. grüne Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)
CHO	Epithelzelle (Ovar)	chin. Hamster
CHO-5.3	stabil mit CD46 (B2) transfiziert	
B95a	B-Zelle (EBV-transformiert, EBV-produzierend), adhärenter Klon	Krallenaffe (<i>Callithrix jacchus</i>)
BJAB	B-Zelle (EBV-transformiert)	Mensch
Raji	B-Zelle (EBV-transformiert)	Mensch
U937	monozytische Zelle (Lymphom)	Mensch
Jurkat	Leukozyt (akute T-Zell Leukämie)	Mensch
PBMC	Primärzellen aus Vollblut	Mensch
DH82	Makrophagen	Hund
BHK	Nierenzelle	Hamster
LoVo	Colon Adenokarzinom-Zellen	Mensch
HeLa	Epithelzelle (Zervixkarzinom)	Mensch
HeLa-pOND-LP	persistierend mit CDV-OND-LP infiziert	
HeLa-pOND-SP	persistierend mit CDV-OND-SP infiziert	
HeLa-pBussell	persistierend mit CDV-Bussell infiziert	
HeLa-pA75/17-V	persistierend mit CDV-A75/17-V infiziert	
HeLa-pROCKBURN	persistierend mit CDV-ROCKBURN infiziert	
HeLa-pDog/NI	persistierend mit CDV-Dog/NI infiziert	

Die CHO-Transfektante CHO-5.3. wurden von Dr. B. Loveland, The Austin Research Institute, Australien, zur Verfügung gestellt. Alle anderen Zellen waren am Institut verfügbar und können mit Ausnahme der BJAB-Zellen (Menezes et al., 1975) bei der American Type Culture Collection (ATCC) bezogen werden. Die humanen peripheren mononukleären Zellen des Blutes (PBMC) wurden aus "buffy coats" des Roten Kreuzes gewonnen. Die persistierend mit verschiedenen CDV-Stämmen infizierten HeLa-Zelllinien wurden im Rahmen dieser Dissertation erzeugt.

2.2 Viren

CDV-Stamm	Typ	Zelltyp für Probagation
OND-LP	Variante der Onderstepoort Vakzine	Vero-Zellen
OND-SP	Variante der Onderstepoort Vakzine	Vero-Zellen
Bussell	Variante der Onderstepoort Vakzine	Vero-Zellen
CDV-A75/17-V	Auf Vero adaptierter Wild-Stamm A75/17	Vero-Zellen
ROCKBURN	Vakzine-Stamm	Vero-Zellen
Dog/NI	Auf Vero adaptiertes Wild-Isolat (Nordirland)	Vero-Zellen
HAN2245/95	Auf Vero adaptiertes Wild-Isolat (Deutschland)	Vero-Zellen

Der CDV-Stamm HAN2245/95 wurde von Prof. Dr. L. Haas, Tierärztliche Hochschule Hannover, Deutschland zur Verfügung gestellt, alle anderen CDV-Stämme erhielten wir von Prof. Dr. B. Rima, The Queen's University of Belfast, Belfast, UK.

Der Italia-Stamm des Newcastle Disease Virus (NDV) wurde von Prof. Dr. C. Jungwirth, Würzburg, zur Verfügung gestellt und in BHK-Zellen probagiert.

2.3 Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmide, die zur die Herstellung der CDV-N und GAPDH-Sonden für die Northern Blots nötig sind, wurden der Gram-positive Bakterienstamm *Escherichia coli* (*E. coli*) DH5 α verwendet.

2.4 Plasmide

Zur Herstellung eines 550 bp-Fragments des CDV-N Genes wurde das Plasmid pCDV28 (3,6 kb), welches uns von Prof. Dr. B. Rima überlassen wurde, verwendet. Das Plasmid pCDV28 besteht aus dem Vektor pGEM-2 (Promega Biotec) in dessen Multiple Cloning Site das N-Gen von CDV-Onderstepoort kloniert wurde. Das CDV-N-Fragment wird mittels eines Restriktionsverdau mit dem Restriktionsenzym PstI gewonnen.

Ein 1,4 kb Fragment der Ratten-Glyceraldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase (GAPDH) cDNA wurde aus dem Plasmid pSP65ratGAPDH (4279 bp) durch Restriktion mit EcoRI und BamHI geschnitten.

2.5 Primer

„upper“ Universal P-Primer für RT und PCR:

5' ATG TTT ATG ATC ACA GCG GT 3' (20-mer)

(Start an Position 2132 des CDV Genoms)

„lower“ Universal P Primer für PCR:

5' ATT GGG TTG CAC CAC TTG TC 3' (20-mer)

(Start an Position 2563 des Komplementärstranges)

„upper“ F/H-Primer für RT und PCR:

5' AGG TAC AAA CTT AGG GAA CGC 3' (21-mer)

(Start an Position 6647 des CDV Genoms)

„lower“ F/H-Primer für PCR:

5' AAA CTT TGC CTA CTG AAG TAG 3' (21-mer)

(Start an Position 7674 des Komplementärstranges)

2.6 Antikörper

2.6.1 Primärantikörper

Antikörper (Subtyp)	Spezifität	Herkunft/Typ	Hersteller
K41 (IgG1)	CD9	M/m	S. Löffler
SYB-1	CD9	M/m	E. Rubinstein
10/88	CD46 (SCR3+4)	M/m	S. Löffler
13/42	CD46 (SCR1)	M/m	S. Löffler
8D1(IgG1)	CDV-H	M/m	S. Löffler
2E11 (IgG1)	CDV-H	M/m	S. Löffler
H-9.	CDV-N	M/m, bio	S. Löffler
Dog HI-Serum	CDV	D/p	M. Appel
HBJ 127	FRP-1/CD98 (schwere Kette)	M/m, A	Y. Ito
6-1-14	FRP-1/CD98 (schwere Kette)	M/m, A	Y. Ito
4-5-1	FRP-1/CD98 (schwere Kette)	M/m, A	Y. Ito

Alle verwendeten monoklonalen Antikörper gegen CDV-Antigene, gegen das CD46 und der mAK K41 wurden im Institut von Frau S. Löffler als Hybridom-Antikörper aus der Maus hergestellt und in der Durchflußzytometrie und in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1:100 eingesetzt. Das polyklonale Hunde-Hyperimmun-Serum gegen CDV wurde freundlicherweise von M. Appel (Veterinary Virus Research Institute, Cornell University, Ithaca, New York, USA), zur Verfügung gestellt und ebenfalls in einer Verdünnungen von 1:100 für FACS und IF eingesetzt. Die monoklonalen und Aszites-Antikörper gegen FRP-1/CD98 erhielten wir freundlicherweise von Prof. Dr. Y. Ito (Department of Microbiology, Mie University, Edobashi, Japan)

M: Maus; D: Hund; m: monoklonal; p: polyklonal; A: Aszites; bio: Biotin-markiert

2.6.2 Sekundärantikörper

Kaninchen anti Hund (IgG H+L), FITC Dianova

Kaninchen anti Maus (Fc), FITC DAKO

Kaninchen anti Maus (Fc), POX Dianova

Zur Detektion des Biotin-markierten H-9-mAk wurde das Konjugat Streptavidin-PE, Dianova, verwendet.

2.7 Medien, Chemikalien und Enzyme

2.7.1 Zellkultur

Ampicillin	Bayer
ATV	Medienküche
Dimethylsulfoxid DMSO	Merck
Ethylendiamintetraacetat; EDTA	Appllichem
FKS (Fötale Kälberserum)	Gibco, Linearis
HBSS-Medium	Medienküche
L-Glutamin	Seromed
Lipofektin	Gibco
Methionin/Cystein-freies Medium	ICN
MEM	Medienküche
NaHCO ₃	Medienküche
Opti-MEM	Gibco
PBS	Medienküche
RPMI 1640	Medienküche

2.7.2 Bakterienkultur

LB-Medium:

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

2.7.3 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	MBI Fermentas
Klenow-Polymerase	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	MBI Fermentas/Boehringer/Biolabs
Superscript II Reverse Transkriptase	Gibco
Taq-DNA-Polymerase	MBI Fermentas

2.7.4 Chemikalien

Die verwendeten Chemikalien wurden mit Ausnahme der unten aufgeführten in pro analysi-Qualität von den Firmen Sigma, Merck, Ferak, Calbiochem, Biomol oder Roth bezogen.

β-Mercaptoethanol	Sigma
Acrylamid	Sigma
Agar	Difko
Agarose	FMC Bio Products
Ammoniumpersulfat APS	BioRad
CHAPS	Applichem
d-NTP Mix	MBI-Fermentas
Formaldehyd, 37%	Merck
Guanidinthioisocyanat	Fluka
Mineralöl	Merck
Protein A Sepharose	Pharmacia
Protein G Sepharose (fast flow)	Pharmacia
Proteinase-Inhibitoren "complete"	Boehringer
S-NHS-Biotin	Pierce

2.7.5 Radiochemikalien

³² P-dCTP	Amersham
³⁵ S-L-Methionin und ³⁵ S-Cystein	ICN
[methyl- ³ H]-Thymidin	Amersham

2.7.6 Peptide

FIP (Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH)	Bachem
RGD (H-Arg-Gly-Asp-OH)	Bachem
Cyclo-RGD (cyclo-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val)	Bachem
GRGESP (H-Gly-Arg-Gly-Glu-Ser-Pro-OH)	Bachem

2.7.7 Fluoreszenzfarbstoffe

Rhodamin R18 (rot, Markierung der Membran)	Molecular Probes
Calcein (grün, Markierung des Zytosol)	Molecular Probes
Hoechst H33258 (blau, Markierung von DNA)	Sigma

2.8 Lösungen und Puffer

Coomassie-Färbelösung:	0,25% Coomassie-Blau, 30% Methanol, 10% Eisessig
Einfriermedium:	FKS, 10% DMSO
Farbpuffer (DNA/RNA)	50% Glycerin, 0,4% Bromphenolblau, 0,4% Xylencyanol
FACS-Puffer (FP):	0,4% BSA, 0,02% Na-Azid in Ca/Mg-freiem PBS
MOPS (10x):	0,4 M Morpholinopransulfonsäure, 100mM NaOAc, 10 mM EDTA (pH8)
Proteingelpuffer (10x):	3,03% Tris, 14,4% Glyzin, 1% SDS
Proteinprobenpuffer (4):	250 mM Tris (pH 6,8), 20% β -Mercaptoethanol, 40% Glycerol, 10% SDS, 0,04% Bromphenolblau
RIPA-Detergenz (10x):	1,5 M NaCl, 200 mM Tris-HCl pH7,4, 100 mM EDTA, 10% DOC, 10% Triton X-100, 1% SDS, 10 mM PMSF
RIPA-Puffer (10x):	1,5 M NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,4
RNA-Probenpuffer:	50% Formamid, 15% Formaldehyd in 1x MOPS
TAE-Puffer (10x):	0,4 M Tris-COOCH ₃ , 10 mM EDTA
TE-Puffer:	10 mM TrisHCl (pH 8), 1 mM EDTA
Hybridisierungslösung: (Norther Blot)	50% Formamid, 6x SSPE (43 g/l NaCl, 6,9 g/l NaH ₂ PO ₄ , 1,85 g/l EDTA, pH 7,2), 5x BFP (1 g/l Ficoll, 1g/l BSA, 1 g/l Polyvinylpyrrolidon,), 300 μ g/ml Lachs-DNA, 0,3% SDS
Resuspensionspuffer (Puffer 1):	50 mM TrisCl pH 8,0 , 10mM EDTA, 100 μ g RNase
Lysepuffer (Puffer 2):	200 mm NaOH, 1% SDS
Neutralisationspuffer (Puffer 3)	3 M Potassium Azetat pH 5,5

2.9 Kits

DNA Labelling Kit	MBI Fermentas
EndoFree Plasmid MaxiKit	Qiagen
Isotypenbestimmungskit für Maus-mAK	Holland Biotechnology BV
QIA prep spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAEX II Gel Extraction Kit	Qiagen
Qia-Filter Plasmid MidiKit	Qiagen
Random Primed Labeling Kit	Boehringer
RNeasy Mini Kit	Qiagen
TRPO-562 (Proteinbestimmung)	Sigma

2.10 Verbrauchsmaterial

AGFA Chrom APx100 Farbdiafilm	AGFA
AGFA Pan APX 100 S/W Film	AGFA
Kodak EL 400 Farbdiafilm	Kodak

Dialyseschläuche	Serva
Einmalhandschuhe	Rotiprotect, Roth
Einmalküvetten	Hartenstein
Glasküvetten	Pharmacia
Kammerobjektträger	LabTek
Nitrozellulosemembranen	Schleicher und Schuell
Pipettenspitzen	Eppendorf
Plastikartikel für Bakterien-und Zellkultur	Falcon, Greiner, Nunc
ProteinA-Sepharose	Pharmacia
PVDF-Membran	Millipore
Sterilfilter	Schleicher und Schuell/Eppendorf
Zentrifugenröhrchen	Kontron
QIAshredder	Qiagen

2.11 Geräte

Apparaturen für horizontale und vertikale Elektrophorese: Werkstatt des Instituts

Analysenwaage	Sartorius
Autoklav	MM, München
Bakterienschüttler	Infors
Brutschränke	Heraeus
FACSSanner	Becton-Dickinson
Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Geltrockner	BioRad
Glasplatten, Spacer, Kämmen	BRL, BioRad
Halbtrockenblotkammer	Werkstatt des Instituts
Hybridisierungsofen	WTW
Laborwaage	Mettler
Mehrkanalpipette	Flow Laboratories
Mikropipetten	Eppendorf/Socorex/Gilson
Mikroskop (Durchlicht)	Leitz
Netzgeräte	BioRad
PCR-Maschine	Perlin Elmer
pH-Meter	WTW
Phosphor-Imager	Molecular Dynamics
Phosphor-Imager-Platten	Molecular Dynamics
Quarzküvetten	Hellma
Rotoren	Hettich, Sorvall, Beckmann
Spektrometer	Pharmacia

Sterilbank	Heraeus/Gelaire
Tischzentrifuge	Hettich, Eppendorf
Ultrazentrifuge	Sorvall, Du Pont Industries
UV-Lampe	Desaga
Vortexer	Bender+Hobein
Wasserbad	Hartenstein
Wippschüttler	Bühler
Zählkammer	Neubauer, Thoma
Zentrifugen	Sorvall, Beckmann, Hettich

3. Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur adhärenter Zellen

Alle adhärenenten Zelllinien wurden in Plastikflaschen in NaHCO_3 -gepuffertem MEM, FKS (5% für Vero-Zellen, 10% für HeLa-, LoVo- und CHO-Zellen) und Antibiotika in einem 37°C -Brutschrank unter 5% CO_2 -Begasung kultiviert, nach Bildung eines dichten Zellrasens mit ATV-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:5 in neue Flaschen ausgesät. Die B95a-Zucht verlief ebenso, jedoch wurde RPMI 1640 mit 10% FKS statt MEM verwendet. Vero- und HeLa-Zellen für die Virusproduktion wurden in Roux-Glasflaschen oder 650 ml Gewebekulturflaschen mit NaHCO_3 -gepuffertem MEM, 5% FKS, Antibiotika und 10 ml/l L-Glutamin (200 mM) im 37°C -Brutschrank ohne CO_2 -Begasung kultiviert. Nach Erreichen konfluenter Monolayer wurden die Zellen mit ATV-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:10 in neue Flaschen ausgesät.

Für einige Experimente in der Durchflußzytometrie und Immunfluoreszenz wurden die jeweiligen Zellen durch Inkubation mit Ca/Mg-freiem HBSS-Medium, 5 mM EDTA von der Oberfläche der Kulturflaschen abgelöst, sorgfältig resuspendiert und gezählt.

3.1.2 Zellkultur von Suspensionszellen

Suspensionszellen wurden in Plastikkulturflaschen verschiedener Größen im 37°C -Brutschrank unter 5%iger CO_2 -Begasung in NaHCO_3 -gepuffertem RPMI, 10% FKS, Ampicillin und 10 ml/l L-Glutamin (200 mM) kultiviert. Nachdem die Zellen dicht gewachsen waren, wurden sie im Verhältnis 1:5 auf neue Kulturflaschen aufgeteilt.

3.1.3 Kultur von Hybridomzellen zur Antikörpergewinnung

Hybridomzellen entstanden durch die Fusion von Antikörper produzierenden Milzzellen der Maus mit immortalisierten Maus-Myelomzellen SP2/0. Hybridomazellen heften sich zwar leicht an die Oberflächen der Kulturgefäße an, gehören aber nicht zu den richtig adhärenenten Zellen und lassen sich einfach durch Abspülen wieder ablösen. Für die Antikörperproduktion wurden die Hybridomzellen als dichter Zellrasen bis kurz vor Beginn des Zelltodes kultiviert und der Kulturüberstand für die Antikörperaufreinigung entnommen.

Hybridom Medium: RPMI1640, 10% FKS, Ampicillin, 20 ml/l L-Glutamin (400 mM), 10 ml/l Pyruvat (100 mM), 10 ml/l nicht essentielle Aminosäuren 100x

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

$3\text{-}5 \times 10^6$ Zellen wurden abzentrifugiert (10 Minuten, 4°C , 1200 rpm) und das Pellet anschließend in kaltes Einfriermedium (FKS, 10% DMSO) überführt. Das Einfrieren erfolgte schrittweise für zwei Stunden bei -20°C , über Nacht bei -80°C und anschließende Über-

führung in flüssigen Stickstoff. Zum Auftauen wurde die gefrorene Zellsuspension schnell in einem handwarmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in einen zehnfachen Überschuß an kaltem Medium überführt, um das DMSO auszuverdünnen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (10 Minuten, 4°C, 1200 rpm), in frischem Medium aufgenommen und in zwei kleine Zellkulturflaschen überführt. Am nächsten Tag wurde das Medium nochmals erneuert, um bereits tote Zellen zu entfernen.

3.1.5 Isolierung von PBMC's aus Vollblutspenden

Als Ausgangsmaterial wurden "buffy coats" des Roten Kreuzes verwendet. Die Isolierung von peripheren Blut mononukleären Zellen (PBMC) unter Abtrennung von Makrophagen erfolgte über einen Ficoll Gradienten. Das Blut wurde in 50 ml Falcon Röhrchen überführt und 1:2 mit PBS ohne Ca/Mg + 1% EDTA gemischt. In zehn 15 ml Falcon Röhrchen wurden je 5 ml Ficoll steril vorgelegt und anschließend vorsichtig langsam mit dem vorverdünnten Blut überschichtet. Der Gradient wurde 30 Min. bei 1600 rpm und RT zentrifugiert. Anschließend wurde die Lymphozytenschicht mit einer 2ml Pipette abgesaugt und in 50 ml Falcon Röhrchen Ca²⁺/Mg²⁺-freiem PBS zweimal gewaschen. Das Zellpellet wurde mit 20 ml RPMI + 10% FKS in zwei mittlere Zellkulturflaschen überführt und die Flaschen 1-2 Stunden liegend bei 37°C inkubiert. Dabei adhären die Makrophagen und die Lymphozyten können vorsichtig abgenommen werden. Nach der Entfernung der Makrophagen wurde die Zellzahl bestimmt und 20 ml Zellsuspension mit 5x10⁶ Zellen/ml in eine 250 ml Gewebekulturflaschen in Suspension ausgesät und über Nacht zur Erholung bei 37°C inkubiert. Nach erneutem Mediumwechsel waren die PBMC's für Versuche einsetzbar.

3.1.6 PHA-Stimulierung von PBMC's

1x10⁶ PBMC's wurden in einem 15 ml Polystyrol-Röhrchen in 10 ml RPMI + 10% FKS aufgenommen. Anschließend wurden 2 ml einer in RPMI verdünnten PHA-Lösung mit der Konzentration von 2,5 µg/ml hinzugegeben, so dass pro 1x10⁵ Zellen 200 µl PHA-Lösung vorhanden waren. Die Zellen wurden dann für 72 Std. mit diesem Nährmedium inkubiert und anschließend für die Proliferationsversuche verwendet.

3.1.7 Proliferationsassay mit Vero-Zellen

Die Wirkung von mAK K41 auf die Proliferation wurde in Dreifach-Ansätzen über einen Vergleich des Einbaus von [methyl-³H]-Thymidin in Vero-Zellen in An- und Abwesenheit von mAK K41 untersucht. 1x10⁴ Vero-Zellen wurden pro Napf einer 96-Clusterplatte ausgesät und zur Anheftung der Zellen mindestens 3 Std. im Brutschrank inkubiert. Danach wurde einem Teil der Ansätze mAK K41 (12 µg/ml Medium) zugegeben. Die ³H-Thymidin-Zugabe erfolgte in allen Ansätzen entweder direkt nach oder 24 Std. nach Zugabe des mAK K41. ³H-Thymidin wurde dem Medium in drei verschiedenen Konzentrationen hinzugefügt (0,5 µCi, 1 µCi und 2,5 µCi) und die Zellen für 24 Std. in dem Thymidin-haltigen Medium inkubiert. Die

Zellen wurden im Harvester lysiert und auf Filter übertragen. Die Einbauraten von ^3H -Thymidin in die DNA wurden dann im Beta-Plate bestimmt.

3.1.8 Proliferations-Hemmtest

Die Hemmung der Proliferation von PBMC's durch CDV oder persistent CDV-infizierte Zellen wurde über die Messung des Einbaus von ^3H -Thymidin mit dem Beta-Plate in Dreifach-Ansätzen bestimmt. Dazu wurden in Näpfe (A1-3,4-6 etc.) einer 96-Napf-Platte (Flachboden) 100 μl PHA-stimulierte PBMC (=Responder Zellen, 1×10^5 PBMC/Napf) vorgelegt. Als Presenter-Zellen wurden UV-inaktivierte, persistent CDV-infizierte HeLa-Zellen (im Verhältnis 1:5 bis 1:40) oder UV-bestrahltes Virus (MOI 1 bis 0,05) zugegeben. Für die Inaktivierung wurden 1 ml Zellen oder Virus in 3 cm Kulturschalen 5 Min. im Biolinker mit UV-Licht bestrahlt ($1,5 \text{ J/cm}^2$). Anschließend wurden die Ansätze für 48 Std im Brutschrank inkubiert. Pro Napf wurden dann 50 μl ^3H -Thymidin (0,5 μCi /Napf in 50 μl Medium vorverdünnt = 50 μl ^3H -Thymidin/5ml RPMI) zugegeben. Der Einbau des Thymidins erfolgte für 24 Std. im Brutschrank. Danach wurden die Zellen mit dem Harvester auf Filter übertragen, lysiert und die Filter anschließend im Trockenschrank bei 60°C 1 Std. getrocknet. Die Filtermatten wurden dann mit 10 ml Scintillator-Flüssigkeit in Folien eingeschweißt und die ^3H -Thymidin-Inkorporation im Beta-Plate (Programm 4) gemessen.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 CDV-Produktion auf adhärennten Zellen

Zur Herstellung von Virusstocks der verschiedenen CDV-Stämme wurden Vero-Zellen in 650 ml Kulturflaschen verwendet. Zu 80% konfluente Monolayer von Zellen wurden mit CDV MOI=0,01 in 10 ml serumfreiem Medium infiziert. Nach einer Inkubation von 60 Min. bei 37°C wurde das Medium entfernt und die Zellen mit 20 ml frischem Medium + 5% FKS versorgt. Synzytiuminduzierende Stämme wurden bei 33°C bis zum Erreichen des maximalen CPE (2-3 dpi) und die NSI-Stämme 5-6 Tage bei 37°C kultiviert. Zur Isolation des Virus wurde das Medium soweit entfernt, dass der Boden der verwendeten Kulturflasche gerade noch bedeckt war (5-4 ml), und die Flasche über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen langsam bei 4°C aufgetaut und das zellgebundene Virus durch vorsichtiges Hin- und Herpipettieren oder mit Hilfe eines Zellschabers freigesetzt. Das Zelldebris wurde durch Zentrifugation für 15 Min. bei 3000 rpm entfernt und der Überstand als Virusstock aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die Produktion von Stocks mit hohem Virustiter wurde der Virusstock nach Pelletierung des Zelldebris in sterile Dialyseschläuche gefüllt und bei 4°C auf PEG gelegt, bis sich das Volumen des Virusstocks in den Schläuchen um ca 70% reduziert hatte. Der so konzentrierte Virusstock wurde nochmals für 5 Min. bei 500 rpm zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen und anschließend für die Lagerung bei -80°C aliquotiert. Die Viruskonzentration der Virusstocks wurde hauptsächlich durch Plaquetests, teilweise aber

auch durch eine Endpunkt-Titration auf Vero-Zellen ermittelt. Die Titer der NSI-Stämme wurden über Endpunkt-Titration mit Überprüfung der Infektionen im FACS bestimmt.

3.2.2 NDV-Produktion

Zur Herstellung eines Stocks des NDV-Stammes Italia wurden zu 80% konfluente Monolayer von BHK-Zellen in 650 ml Kulturflaschen eine Stunde bei 37°C in 10 ml serumfreiem Medium mit 200 µl des Ausgangsstocks infiziert. Danach wurde der Zellrasen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und anschließend mit frischem Medium mit 10% FKS bei 37°C bis zum maximalen CPE (1-2 dpi) weiterkultiviert. Zur Isolation des Virus wurde das Medium bis auf ca. 5 ml entfernt und die Flasche über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag wurden die Zellen langsam bei 4°C aufgetaut und das zellgebundene Virus mit Hilfe eines Zellschabers freigesetzt. Das Zelldebris wurde durch Zentrifugation für 15 Min. bei 3000 rpm entfernt und der Überstand als Virusstock aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Viruskonzentration wurde durch einen Plaquetest auf BHK-Zellen bestimmt.

3.2.3 Bestimmung von Virustitern durch Endpunktiteration

Generell wurde der Virustiter auf den Zellen bestimmt auf denen die Viren auch kultiviert wurden. Zur Bestimmung von SI-CDV-Titern wurden die entsprechenden Stocklösungen oder Proben in Dreierschritten in FKS-freiem Medium bei 4°C verdünnt. Je 100 µl jeder Verdünnung wurde dann auf einen ca. zu 60% konfluenten Zellrasen (Vero-Zellen für CDV-Stämme, BHK-Zellen für NDV) in 96-Clusterplatten (ca. $1,5 \times 10^4$ Zellen/Napf in 100 µl MEM ohne FKS) gegeben und 1 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurde das infektiöse Medium abgenommen und die Zellen mit 200 µl frischem MEM + 5% FKS versorgt. Nach 5-6 Tagen Inkubation konnte das Ergebnis der Virustitration anhand des CPE's abgelesen werden. Der Virustiter ergab sich dabei aus der Verdünnungsstufe des letzten Napfes, in dem das Virus noch zu einer Infektion führte. Pro Stock wurden drei unabhängige Verdünnungsreihen ausgewertet und der Titer aus dem Mittelwert der einzelnen Ansätze ermittelt.

Zur Bestimmung des Titers von NSI-CDV-Stocks wurden die entsprechenden Stocklösungen 1:1000 in serumfreiem Medium vorverdünnt und dann in Zweierschritten weiter verdünnt. Je 100 µl jeder Verdünnung wurden wiederum zu einem 60% konfluenten Zellrasen (Vero-Zellen) in 96-Clusterplatten gegeben, 1 Std. bei 37°C inkubiert und das infektiöse Medium gegen frisches Medium mit 5% FKS ausgetauscht. Nach 5-6 Tagen Inkubation wurden die Zellen mit ATV abgelöst, permeabilisiert und mit Hilfe eines anti-CDV-N-Antikörpers im Durchflußzytometer auf Infektion überprüft. Der Virustiter ergab sich dabei aus der Verdünnungsstufe des letzten Napfes, in dem noch eine deutliche Infektion nachweisbar war. Pro Stock wurden zwei unabhängige Verdünnungsreihen ausgewertet und der Titer aus dem Mittelwert der beiden Ansätze ermittelt.

3.2.4 Plaquetest (SI-CDV-Stämme)

Zur Bestimmung von CDV-Titern wurden Stocklösungen in Zehnerschritten in FKS-freiem Medium bei 4°C verdünnt. Je 1ml jeder Verdünnung wurde dann auf einen fast konfluenten Vero-Zellrasen in 6-Napfplatten (ca. 1×10^6 Zellen/Napf) gegeben und auf den Zellen für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wurde das virus-haltige Medium abgezogen, zweimal mit serumfreiem Medium gewaschen und vorsichtig mit Overlay-Agar (15 ml 2%iger Agar + 15 ml 2x Medium 10% FKS + 10 ml 1x Medium 10% FKS) überschichtet. Nach Polymerisation des Agars bei RT wurden die Zellen bis zum Auftreten deutlicher Plaques (5-6 dpi) bei 37°C inkubiert und anschließend in der Vitalfärbung mit 1 ml Neutralrotlösung (1:200 in PBS verdünnt) für 1 Std. gefärbt. Nach Abziehen der Färbelösung wurden die Zellen für weitere 10-15 Std. inkubiert, bevor die entstandenen Plaques auf der Lichtplatte ausgezählt werden konnten. Pro Virusstock wurden 3 unabhängige Platten ausgezählt und der Mittelwert als Titer angenommen.

3.2.5 Plaquereinigung

Um die Anreicherung von defekten Viruspartikeln zu minimieren, wurde bei den Viren, die auf adhärennten Zellen gezogen wurden, für den Ausgangsstock (Master Stock) eine Plaque Reinigung durchgeführt. Der zu reinigende Virusstock wurde in 1:10 Verdünnungsreihen in einer 6-Clusterplatte mit zu 80% konfluenten Vero-Zellen ausgesät. Nach einer Stunde Infektion bei 37°C wurde das Medium abgezogen und der Zellrasen mit Overlay-Agar (0,75% Agar in MEM+10%FKS) überschichtet. Die Zellen wurden bis zum Erscheinen von Plaques bei 37°C inkubiert. Große Einzelplaques wurden mit einer Pasteurpipette vorsichtig ausgestochen und in kleine Zellkulturflaschen mit zu 80% konfluenten Vero-Zellen überführt. Aus den infizierten Kulturen wurden wiederum Virusstocks gewonnen und diese erneut einer Plaque-Reinigung unterzogen, wobei für die Herstellung eines Master-Stocks die Plaque-Reinigung dreimal wiederholt wurde.

3.2.6 Virusbindungs-Assay

Adhärennte Zellen wurden mit PBS (ohne Ca/Mg) + 1 mM EDTA abgelöst und anschließend einmal in PBS ohne Ca/Mg gewaschen. Je 2×10^4 Zellen der zu testenden Zelllinien in 100 µl PBS wurden bei 4°C oder 37°C für eine Stunde mit Virus (MOI > 5) in FACS-Röhrchen inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit FACS Puffer gewaschen und mit dem polyklonalen Hunde-Hyperimmun-Serum oder dem mAK anti-CDV-H 8D1, sowie den respektiven, FITC-konjugierten Sekundärantikörpern gefärbt und anschließend mit 3,7% PFA fixiert (Lebendfärbung). Die Menge an gebundenem Virus wurde in einem FACScan-Durchflußzytometer bestimmt. Es wird der Quotient aus der medianen Fluoreszenzintensität (mfi) der mit Virus inkubierten Ansätze und der medianen Fluoreszenzintensität der Ansätze ohne Virus gebildet.

Für Versuche zur Hemmung der Virusbindung durch Antikörper wurden die Zellen (2×10^4) vor Inkubation mit dem Virus für 1 Std. bei Raumtemperatur mit $100 \mu\text{l}$ Antikörper-Lösung inkubiert: Der Antikörper sollte dabei in einer Konzentration von ca. $100 \mu\text{g/ml}$ ($\Rightarrow 10 \mu\text{g}/100 \mu\text{l}$) eingesetzt werden und mit Medium + 10% FKS verdünnt sein. Nach der Inkubationszeit wird Virus (MOI = 10) zugeben. Anschließend werden die Zellen wie oben beschrieben inkubiert, gewaschen, mit dem polyklonalen Hundeserum und FITC-konjugierten Kaninchen-anti-Hund mAK gefärbt. Die Analyse der Menge an gebundenem Virus wurde dann im Durchflußzytometer durchgeführt.

3.2.7 Viruspermissivitätsversuche

Für die Untersuchung der Viruspermissivität verschiedener Zellen wurden diese zuerst zu 80% Konfluenz in 48-Clusterplatten ausgesät (5×10^4 Zellen/Napf in 1 ml MEM oder RPMI mit 10% FKS). Anschließend wurde das Virus mit einer MOI von 0,1 hinzugegeben und bei Suspensionskulturen auf den Zellen belassen. Adhärenz Zellen wurden mit Virus 1 Std. bei 37°C inkubiert und anschließend das virushaltige Medium gegen frisches Medium ausgetauscht. Nach 5 Tagen werden die Zellen geerntet, permeabilisiert und nach Färbung mit einem polyklonalen Serum gegen CDV die Anzahl infizierter Zellen im Durchflußzytometer bestimmt.

3.2.8 Infektions-Inhibitions-Versuche mit Antikörpern

Untersuchungen der Hemmung von CDV-Infektionen durch mAK K41 mittels Immunfluoreszenzmikroskopie wurden mit Objektträger mit acht aufgesetzten Kammern (LabTek) durchgeführt. Vero-Zellen wurden zu 80% Konfluenz ausgesät und über Nacht bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Die Infektion der Zellen erfolgte durch einstündige Inkubation mit MOI's von 0,01 oder 0,005 in serumfreiem Medium. Nach Infektion wird das virushaltige Medium mit frischem Medium ausgetauscht und die Zellen bei 37°C kultiviert. Zur Untersuchung der Wirkung von Antikörpern wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten vor oder nach der Infektion mit mAK K41 oder Kontroll-AK vorinkubiert. Dazu wurde das Medium in den Kammern durch $100 \mu\text{l}$ Antikörperlösung ($10 \mu\text{g}$ Antikörper in $100 \mu\text{l}$ serumfreiem Medium) ersetzt und die Zellen 1 Std. bei RT inkubiert. Nach der Inkubationszeit wurde die Antikörperlösung abgenommen, einmal mit Medium gewaschen und frisches Medium in die Kammern gegeben. 44 Std. nach Infektion erfolgt die Auswertung im Immunfluoreszenz-Mikroskop nach Immunfluoreszenz-Färbung der Zellen.

Zur Untersuchung der Wirkung von K41 auf die Virusproduktion bei multizyklischer Virusreplikation wurden Vero-Zellen zu 80% Konfluenz in 4-Clusterplatten (ca. $1,4 \times 10^5$ Zellen/Napf) ausgesät und 6 Std. zur Adhärenz inkubiert. Eine Stunde vor oder nach Infektion mit CDV (MOI = 0,005) wurden die Ansätze mit $100 \mu\text{l}$ K41-Lösung ($100 \mu\text{g/ml}$ mAK K41 in MEM ohne FKS) oder $100 \mu\text{l}$ serumfreiem Medium, wie oben beschrieben, 1 Std. bei RT inkubiert und anschließend das AK-haltige Medium abgenommen. Die Ansätze wurden in

MEM + 5% FKS kultiviert und zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde pro Ansatz zellfreies und zellgebundenes (1x Einfrieren/Auftauen) Virus getrennt geerntet und die jeweilige Virusproduktion durch Endpunkt-Titration gemessen.

Für die Untersuchung der Wirkung von K41 auf die Virusproduktion bei einer einstufigen Wachstumskinetik wurden Vero-Zellen in Suspension für 1 Std. bei 37°C mit einer MOI von 3 infiziert. Danach wurden die Zellen 1x mit MEM (5% FKS) gewaschen und pro Napf einer 4-Clusterplatte $1,5 \times 10^5$ Zellen ausgesät. Dann erfolgte die Zugabe von mAK ins Medium (12 µg/ml), wobei der Antikörper während der weiteren Kultivierung im Medium blieb. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurde zellfreies und zellgebundenes (1x Einfrieren/Auftauen) Virus der Ansätze getrennt geerntet und die jeweilige Virusproduktion durch Endpunkt-Titration bestimmt.

3.3 Histochemische Methoden

3.3.1 Immunfluoreszenzfärbungen für die Durchflußzytometrie

Bei den Immunfluoreszenzfärbungen für die Durchflußzytometrie wurden, falls nicht anders vermerkt, pro Ansatz $1-2 \times 10^5$ Zellen verwendet. Die Färbungen wurden in 5 ml "FACS"-Röhrchen, alle Zentrifugationsschritte in einer vorgekühlten Hettich-Zentrifuge bei 1200 rpm für 10 Min. durchgeführt.

Als "FACS"-Puffer (FP) für die Waschschrte bzw. zur Verdünnung der Antikörper wurde Ca/Mg-freies PBS, 0,4% BSA, 0,02% NaAzid, pH 7,4 verwendet. Primärantikörper und FITC-markierte Zweitantikörper wurden, falls nicht anders vermerkt, 1:100 verdünnt und in einem Volumen von 100 µl für 45 Min. bei 4°C mit den Zellen inkubiert.

Bei den Lebendfärbungen gegen Oberflächen-Antigene wurden die Zellen ohne Fixierung mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert und anschließend zweimal mit je 2ml FP gewaschen. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und anschließend für 10 Min. mit 3,7% PFA (in Ca/Mg-freiem PBS) fixiert. Nach zwei abschließenden Waschschrten wurden die Zellen in 500 µl FP resuspendiert und konnten nun in der Durchflußzytometrie analysiert werden.

Immunfluoreszenzfärbungen gegen intrazelluläre und auf der Zelloberfläche exprimierte Antigene (Gesamtfärbungen) wurden mit Zellen durchgeführt, die nach einem Waschschrte mit 2 ml FP zunächst für 10 Min. bei 4°C mit 100 µl 3,7% PFA, 0,25% TritonX100 (in Ca/Mg-freiem PBS) fixiert und permeabilisiert worden waren. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, die durch die Fixierung/Permeabilisierung generiert werden, wurden die Zellen über Nacht mit 2 ml RPMI, 10% FKS inkubiert. Am nächsten Tag erfolgte die Inkubation mit dem Primärantikörper, gefolgt von zwei Waschschrten und der Inkubation mit dem Sekundärantikörper. Nach abschließendem zweimaligen Waschen wurde das gefärbte Zellpellet in 500 µl FP resuspendiert und konnte nun analysiert werden.

Für die quantitative Analyse wurde ein "Fluorescence activated cell scanner" (FACS) mit Argon-Laser (488 nm) und angeschlossenem Hewlett-Packard Computer mit LysisII-Software verwendet. In diesem Gerät ist es mit Hilfe von Laserlicht möglich, Zellen anhand morphologischer Kriterien wie Größe (im "forward scatter" = FSC) und Granularität (im "side-scatter" = SSC) sowie exprimierter Antigene (nach Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen) zu unterscheiden und mit Hilfe der Computer-Software zu analysieren.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbungen für die Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Objektträger mit acht aufgesetzten Kammern verwendet, oder kleine autoklavierte Glasdeckgläser (12 mm Durchmesser), die in 12-Clusterplatten eingelegt wurden. Die Antikörper-Inkubationen (je 1:100 in PBS verdünnt) fanden in Gesamtvolumina von 100 µl in der feuchten Kammer statt. Die Waschschriffe der Immunfluoreszenzfärbung wurden mit eiskalten Lösungen (PBS) unter leichtem Schütteln in den Kammern oder Nöpfen durchgeführt.

Zur Färbung von Oberflächenantigenen wurden die Zellen mit dem jeweiligen Primärantikörper für 45 Min. auf Eis inkubiert und nach zwei Waschschriffen mit PBS anschließend für 45 Min. mit dem entsprechenden Sekundärantikörper. Bei Doppelfärbungen mit verschiedenen Primär- und Sekundärantikörpern erfolgten die beiden Färbungen nacheinander. Die Antikörper wurden dabei in der Regel 1:200 verdünnt eingesetzt. Die Zellen wurden dann für 7 Min. mit 3,7% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert, nochmals gewaschen und nach kurzem Abtropfen mit einem Tropfen Mounting Medium überschichtet. Auf die Kammerobjektträger wurde ein großes Deckglas aufgelegt und die zellbewachsenen Deckgläserchen wurden auf Objektträger gelegt.

Sollten auch intrazelluläre Antigene gefärbt werden, wurden die nach einem Waschschriff mit 2 ml FP zunächst für ca. 7 Min. bei 4°C mit 100 µl 3,7% PFA fixiert, einmal gewaschen und dann zur Permeabilisierung 10 Min. mit 100 µl 0,25% TritonX100 (in PBS) inkubiert. In verschiedenen Versuchen zeigte sich, dass so die Ablösung von Zellen geringer ausfiel als bei gleichzeitiger Fixierung und Permeabilisierung. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und für 30 Min. (4°C) mit Medium mit 10% FKS inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen, die durch die Fixierung generiert werden, zu blockieren. Die restliche Färbung erfolgt dann nach dem oben beschriebenen Schema.

Die Auswertung erfolgte an einem Fluoreszenz-Mikroskop der Fa. Leitz mit eingebauter Fotoeinheit. Für Fluoreszenz-Aufnahmen wurde manuell eine Belichtungszeit von 20 Sek. für 400 ASA-Filme eingestellt.

3.3.3 Reinigung von monoklonalen Antikörpern

Die Zellkulturüberstände von Antikörper produzierenden Hybridom-Zellkulturen wurden bei 4°C gesammelt. War ein Volumen von mindestens 500 ml erreicht, wurden die Überstände abzentrifugiert, um den Zelldebris zu entfernen und anschließend sterilfiltriert, um kleinste

Partikel zu entfernen, die später die Säule verstopfen könnten. Die Zellkulturüberstände wurden anschließend über eine Protein G Säule geschickt. Die Immunglobuline binden an das Protein G und wurden so aus dem Überstand entfernt. Die gebundenen Antikörper wurden dann mit Glycinpuffer pH 2,7 von der Säule eluiert, und in Röhrchen mit je 0,5 ml vorgelegtem 1 M TRIS pH 11 aufgefangen, um den sauren pH Wert sofort zu neutralisieren. ÜN wurde gegen fünf Liter PBS dialysiert und die AK anschließend portioniert und bei -20°C gelagert.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien

500 ml Bakterienmedium wurden mit 1 ml Bakteriensuspension aus einer frischen *E. coli*-Vorkultur (DH5 α) angeimpft und bei 37°C in einem Bakterienschüttler inkubiert. Um die Bakterien in der logarithmischen Phase zu erhalten, wurde die Bakteriendichte regelmäßig kontrolliert und die Inkubation bei einer optischen Dichte von 0,4 - 0,6 OD₆₀₀ abgebrochen. Alle weiteren Schritte fanden bei 4°C mit vorgekühlten Geräten statt. Die Bakteriensuspension wurde 10 Min. auf 4°C gekühlt und mit 500 rpm für 10 Min. abzentrifugiert. Das Pellet wurde in 200 ml einer eiskalten 0,1 M MgCl₂-Lösung aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Dieses Pellet wurde in 200 ml einer eiskalten 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und 30 Min. bei 4°C inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugation wurde das Zellpellet in 15 ml einer eiskalten, frischen 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und mit 2,5 ml eiskaltem Glycerol vermischt. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

3.4.2 Transformation von Bakterien

100 μ l kompetente DH5 α werden mit 0,1 μ g Plasmid-DNA, bzw. 0,005 μ g bei fertigen Plasmiden, bei 30 Min. auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 Sek. bei 42°C im Wasserbad wird das Cap für weitere 90 Sek. auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium für 45 Min. bei 37°C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien über 5 Min. bei 6000 rpm wird das Bakterienpellet in 80 μ l LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Die Agarplatten werden im Bakterienbrutschrank über Nacht bei 37°C inkubiert.

3.4.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Isolation größerer Mengen Plasmid-DNA erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers mit dem QiaFilter Plasmid-Midi-Kit (die Puffer-Nomenklatur entspricht den Angaben des Herstellers). Zunächst wurde das Bakterienpellet einer 25 ml über-Nacht-Kultur (OD₆₀₀ = 1-1,2) in 4 ml P1 sorgfältig resuspendiert. Durch Zugabe von 4 ml P2 wurden die Bakterien bei RT für 5 Min. alkalisch lysiert und die Reaktion anschließend mit 4 ml P3 neutralisiert.

Das Bakterien-Lysat wurde in die Filter-Kartusche übertragen und für 10 Min. bei RT inkubiert. Nach Filtration durch die Kartusche wurde das geklärte Bakterienlysate (ca. 10ml) in die mit 4 ml Puffer QBT äquilibrierte Quiagen100-Kartusche übertragen, wo die Plasmid-DNA aus der Lösung an die Matrix bindet. Nach zweimaligem Waschen der Säule mit jeweils 10 ml Puffer QC wurde die DNA mit 5ml Puffer QF von der Säulenmatrix eluiert und mit 3,5 ml Isopropanol bei RT präzipitiert. Nach Pelletierung der präzipitierten Plasmid-DNA in Corex-Glasröhrchen bei 15000g und 4°C für 30 Min. wurde die DNA mit 5 ml 70% EtOH gewaschen, erneut pelletiert und abschließend in 50 µl H₂O resuspendiert.

Kleinere Mengen wurden nach dem selben Prinzip mit dem QIA prep spin Miniprep Kit gemäß den Herstellerangaben präpariert. Die erhaltene Plasmid-DNA wurde spektrometrisch vermessen und im Restriktions-Ansatz analysiert.

3.4.4 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung kann photometrisch bestimmt werden, wenn diese Lösung weitgehend frei von Verunreinigungen (Phenol, Agarose, PEG, andere Nukleinsäuren) ist. Über die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm erhält man die Nukleinsäurekonzentration unter der Annahme folgender Werte:

$$1 \text{ OD}_{260} = 40 \text{ µg RNA/ml}$$

$$1 \text{ OD}_{260} = 50 \text{ µg DNA/ml}$$

Der Grad der Verunreinigung durch Proteine kann durch Messung der Extinktion bei 280 nm festgestellt werden. Das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ gibt den Reinheitsgrad der Nukleinsäure wieder. Saubere RNA-Präparationen besitzen einen Quotienten von 2,0 saubere DNA-Präparationen von 1,8. Für die Messungen wurden 5 µl der Nukleinsäurelösung mit H₂O auf 500 µl aufgefüllt und in Quarzküvetten vermessen.

3.4.5 Plasmid Restriktion

Zur Herstellung des CDV-N-Fragments wird dieses aus dem Plasmid pCDV28 mittels Restriktionsendonukleasen, während 90 Min. Inkubation im 37 °C Wasserbad ausgeschnitten. Ebenso wird bei der Herstellung des GAPDH-Fragments aus dem Plasmid pSP65ratGAPDH verfahren:

CDV-N-Fragment	GAPDH-Fragment
10 µg Plasmid	10 µg Plasmid
2 µl Restriktionspuffer	2 µl Restriktionspuffer
10 U PstI	10 U EcoRI
H ₂ O ad 20 µl	10 U BamHI
	H ₂ O ad 20 µl

3.4.6 DNA- und RNA-Gelelektrophorese

Plasmid-DNA-Präparationen, PCR-Amplifikationen und Restriktionsverdau wurden mittels Agarose-Gelelektrophorese analysiert. Dazu wurden 1,2 g Agarose in 120 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle für 2 Min. gekocht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C und Zugabe einer Ethidiumbromidlösung zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml wurde die Lösung in einen Gelschlitten gegossen, der mit einem entsprechenden Kamm zur Erzeugung der Auftragstaschen bestückt war (15er Käme für die Analyse, 3er Käme für die Präparation). Nach Polymerisation des Agarosegels wurde der Kamm entnommen, der Gelschlitten in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, mit Elektrophorese-Puffer (1xTAE) aufgefüllt und das Gel mit den DNA-Proben, die zuvor mit 1/10 Vol. Farbpuffer versehen wurden, beladen. Nach dem Elektrophoreselauf bei 90 V wurden die entsprechend ihrer Größe aufgetrennten DNA-Moleküle im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert bzw. für die Elektroelution aus dem Gel herausgeschnitten.

Intakte RNA-Präparationen eukaryontischer Zellen zeichnen sich durch zwei Banden aus, die durch die Hauptfraktionen der RNA - 18S-rRNA und 28S-rRNA - gebildet werden. Für die verschiedenen Versuche wurde die RNA direkt in 1x RNA-Probenpuffer aufgenommen, für 10 Min. bei 60°C denaturiert, 9+1 mit 10x Farbpuffer versetzt und für 1 Std. bei 90 V in einem denaturierenden Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Durch UV-Licht kann auch hier die RNA sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.4.7 Elektroelution

Die geschnittenen CDV-N und GAPDH-Fragmente wurden im 1%igen Agarosegel bei 0,6 V/cm aufgetrennt. Unter UV-Licht (362 nm) werden die jeweiligen Banden ausgeschnitten und in Dialyseschläuche gegeben, die zuvor mit PBS gewaschen werden. Zu den Gelstücken wurden 500 µl TAE gegeben und die Schläuche blasenfrei mit Klammern verschlossen. In der Elektrophoresekammer wird dann durch Anlegen einer Spannung von 100 V die DNA aus dem Gel eluiert. Um einer Adsorption an den Dialyseschläuchen entgegenzuwirken, wurde die Stromrichtung am Ende der Elution für 10 Min. umgekehrt. Die in TAE gelöste DNA wurde mit Phenol-Chloroform-Isoamylalkohol (25:24:1) und anschließend mit Chloroform-Isopropanol (49:1) gereinigt. Nach Präzipitation mit 2,5 Vol. EtOH wurde die DNA in H₂O resuspendiert und vor ihrer Verwendung zur Herstellung radioaktiv markierter DNA-Sonden im Agarosegel analysiert.

3.5 Virus-Aufnahme-Assay

Für Versuche zur Untersuchung der Wirkung von mAK K41 auf die Virusaufnahme wurden Vero-Zellen in 12-Clusterplatten ausgesät ($6,5 \times 10^5$ Zellen/Napf, MEM + 5% FKS) und über Nacht bei 37°C zur Adhärenz inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium durch MEM + 1% FKS ersetzt. Zur Hälfte der Ansätze wurde mAK K41 (12 µg K41/ml Medium) gegeben

und die Ansätze für weitere 2 Std. bei 37°C inkubiert. Danach wurden zu den Ansätzen Virus in abnehmender MOI (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01 und 0,005) gegeben und die Ansätze im virus-haltigen Medium für 2 Std. bei 37°C im Brutschrank unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Die Infektion der K41-behandelten Ansätze fand dabei in Gegenwart des Antikörpers statt. Nach der Infektion wurden die Ansätze jeweils 2x mit eiskaltem PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen 3 Min. bei 4°C mit saurem Waschpuffer (0,14 M NaCl, 8 mM Glycin, 0,1% BSA; pH 2,5) inkubiert, wodurch außen an den Zellen angeheftete Viruspartikel zerstört werden. Es folgten 3 weitere Waschschrte mit eiskaltem PBS. Anschließend wurden die Zellen mit ATV abgelöst, in 2 ml Eppendorf-Caps mit 0,5 ml MEM + 10% FKS überführt und in der Tischzentrifuge 5 Min. bei 2500 rpm pelletiert. Die pelletierten Zellen wurden dann einer RNA-Isolierung mit dem Qiagen RNeasy-Kit unterzogen.

3.5.1 RNA-Präparation

Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen wurde das Qiagen RNeasy Mini-Kit verwendet, welches sauberere RNA liefert als die Präparation über CsCl-Gradienten und das Risiko einer Degradation der RNA deutlich vermindert. Die Präparation der RNA erfolgte entsprechend der Angaben des Herstellers (die Puffer-Nomenklatur entspricht den Angaben des Herstellers).

Pelletierte Zellen (bis zu 5×10^6 Zellen) wurden in Eppendorf-Caps durch die Zugabe von 350 µl des Guanidinisothiocyanat und β-Mercaptoethanol enthaltenden RLT-Puffers lysiert. Verbliebene Zellklumpen wurden durch kurzes vortexen aufgelöst. Das Lysat wurde auf eine QIAshredder-Spin-Säule in einem 2 ml Cap aufgetragen und durch 2 Min. Zentrifugation bei maximaler Geschwindigkeit in der Tischzentrifuge homogenisiert. Zum Homogenisat wurde dann 350 µl 70% EtOH gegeben und durch pipettieren gemischt. Die Probe wurde dann auf eine RNeasy-Mini-Spin-Säule in einem 2 ml Cap aufgetragen, für 15 Sek. bei 11000 rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Spin-Säule wurde einmal mit 700 µl RW1-Puffer gewaschen, die Säule in ein neues Cap gegeben und mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen (15 Sek. bei 11000 rpm). Es wurde nochmals mit 500 µl RPE-Puffer gewaschen und die Säule zur Trocknung der RNeasy-Membran 2 Min. bei 12000 rpm zentrifugiert. Zur Elution der RNA wurden dann 50 µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der Säule gegeben und 1 Min. bei 11000 rpm in ein neues Cap eluiert. Die isolierte RNA wurde dann im Agarose-Gel (siehe 3.4.6) kontrolliert (je 5 µl Eluat), um sicherzustellen, dass für die anschließende RT-PCR gleiche RNA-Mengen verwendet wurden.

3.5.2 Reverse Transkription (RT)-PCR zum Nachweis von aufgenommenem Virus

Zum Nachweis von viraler, genomischer RNA in den Ansätzen des Virus-Aufnahme-Tests mittels PCR musste die aus den Zellen in 3.6.1 isolierte RNA zunächst in der reversen Transkription unter Verwendung von F/H- oder Universal-P-Primern und Reverser Transkriptase

("Superskript-RTase") in cDNA umgeschrieben werden. Die RT-PCR mit Universal-P-Primern verläuft analog zu der im folgenden beschriebenen RT-PCR für die F/H-Primer:

Pro Ansatz wurde je 10 µl RNA mit 2 µl „upper“ F/H-Primer (1 µg/µl) gemischt, kurz zentrifugiert und 10 Min. bei 70°C erhitzt, damit die RNA-Sekundärstrukturen aufgelöst wurden. Auf Eis wurde dann der RT-Mix hinzugegeben:

RT-Mix: 4µl 5xRT-Puffer (Gibco)
 2 µl 0,1M Dithiothreitol (DTT) (Gibco)
 1 µl 40mM dNTP

Die Ansätze wurden kurz gemischt, zentrifugiert und 2 Min. im Heizblock auf 42°C erwärmt. Anschließend wurde pro Ansatz 1 µl (200 U) Superscript-RTase (Gibco) zugegeben.

Zur Synthese der cDNA wurde die Mischung anschließend für 50 Min. bei 42°C inkubiert. Abschließend wurden die Proben 15 Min. bei 70°C erhitzt und dann auf 4°C abgekühlt. Im Anschluss an die Reverse Transkription wurde mit den Proben dann eine PCR angesetzt.

3.5.3 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Unter Verwendung einer Taq-Polymerase wurden mit Hilfe der F/H-spezifischen Primer in den einzelnen Ansätzen der entsprechende Abschnitt des viralen Genoms amplifiziert. Die PCR-Ansätze wurden wie folgt auf ein Gesamtvolumen von 50 µl zusammenpipettiert:

10 µl ssDNA (aus RT-Reaktion)
5 µl 10x Taq-Puffer (MBI)
2 µl 40 mM dNTP-Mix
5 µl 25 mM MgCl₂
0,5 µl "upper primer" (F/H-Primer)
0,5 µl "lower primer" (F/H-Primer)
26 µl H₂O
1 µl Taq-Polymerase (MBI)

Die Ansätze wurden gemischt, kurz zentrifugiert und mit ca 80 µl Mineralöl überschichtet.

In der PCR-Maschine wurde mit folgendem Programm amplifiziert:

1x:

90°C 4 Min.
53°C 1 Min.
72°C 2 Min.

35x:

90°C 1 Min. (Denaturierung)
53°C 1 Min. (Annealing)
72°C 2 Min. (Polymerisation)

1x:

72°C 7 Min.

Pro Ansatz wurde anschließend im 1%igen Agarosegel je 10 µl der PCR-Reaktionen aufgetragen (siehe 3.4.6).

3.6 Analyse der viralen Proteinsynthese

Die Untersuchung der viralen Proteinsynthese im Rahmen einer einstufigen Wachstums-kinetik in An- und Abwesenheit von mAK K41 erfolgte mittels eines Radio-Immuno-präzipitations-Assays mit ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein als radioaktiven Markern. Dazu wurde zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion (6, 12, 18, 24 und 30 Std. n.I.) die Synthese viraler Protein in den infizierten Zellen anhand des Einbaus des radioaktiven Markers analysiert. Vero-Zellen wurden in Suspension in 15 ml Röhren unter gelegentlichem Schüttel für 1 Std. bei 37°C mit einer CDV-MOI von 3 infiziert. Anschließend wurden die Zellen 10 Min. bei 1200 rpm pelletiert, einmal mit Medium gewaschen und erneut pelletiert. Nach Resuspension in MEM + 5% FKS wurden die Zellen in 6-Clusterplatten ausgesät (8x10⁵ Zellen/Napf). Zur Hälfte der Ansätze wurde dann mAK K41 (12 µg mAK K41/ml Medium) zugegeben. Die Markierung mit dem radioaktiven Methionin und Cystein erfolgte wie im Folgenden beschrieben:

3.6.1 ³⁵S-Markierung

6 Std. vor Ernte der Zellen wurde das Medium vorsichtig abgenommen, der Zellrasen 1x mit PBS gewaschen und pro Napf 2 ml Methionin/Cystein-freies Medium zugeben. Anschließend wurden die Zellen im Brutschrank für 30 Min. "vorgehungert". Pro Ansatz wurde dann 40 µCi des Tran-³⁵S-Labels (ICN) zugeben und für weitere 5,5 Std. im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit mit dem radioaktiven Methionin/Cystein wurden die Zellen geerntet und die Proteine mittels Immunopräzipitation isoliert.

3.6.2 Immunopräzipitation

Die Zellen wurden mit HBSS (ohne Ca und Mg/ 1 mM EDTA) geerntet, 5 Min. bei 2000 rpm zentrifugieren und der Überstand abgenommen (radioaktiver Abfall!). Alle anschließenden Schritte wurden auf Eis durchgeführt. Das Zellpellet wurde in 150 µl RIPA-Puffer resuspendiert, 150 µl RIPA-Detergenz (mit Proteaseinhibitoren) zugeben, kurz gevortext und die Ansätze für 30 Min. auf Eis stehen gelassen. Die Proben wurden dann 10 Min. bei 10000 rpm zentrifugiert (gekühlte Eppendorffzentrifuge) und jeweils der Überstand der Lyse (ca. 280 µl) abgenommen und in ein neues Cap überführt. Zu jedem Cap wurden 10 µl des Hunde-Hyperimmun-Serums (an Vero-Zellen voradsorbiert) gegeben und 2 Std. auf Eis inkubiert. Pro Ansatz wurde dann 20 µl Protein-A-Sepharose zugegeben und die Proben im Kühlraum auf einem Schüttler (verhindert ein Absetzen der Sepharosekügelchen) für eine weitere Stunde inkubiert. Danach wurden die Ansätze viermal mit 1 ml eiskaltem RIPA gewaschen, d.h. die Sepharosekügelchen zentrifugiert (20 Sek., 10000 rpm) und der Überstand verworfen. Abschließend wurde das Sepharose-Pellet (ca. 20 µl) mit 40 µl Ripa-Puffer und 20 µl reduzie-

rendem Probenpuffer versetzt und 5 Min. auf 95°C erhitzt. Die Sepharose wurde 3 Min. bei 12000 rpm abzentrifugiert. Zur Analyse der Proben mittels Protein-Gelelektrophorese wurde im SDS-PAGE jeweils 50 µl Überstand/Spur auftragen.

3.6.3 Protein-Gelelektrophorese

Proteine (aus Immunopräzipitation) wurden in einem diskontinuierlichen 10%igen Polyacrylamidgel (nach Laemmli) elektrophoretisch aufgetrennt. Für ein Gel mittlerer Größe wurden verwendet:

Trenngel: 10,0 ml 30%ige Acrylamidlösung
 11,2 ml 1M Tris-HCl, pH 8,8
 8,5 ml H₂O
 0,3 ml 10% SDS
 0,2 ml 10% APS
 50 µl TEMED

Die Trenngel-Lösung wurde blasenfrei bis etwa 4 Zentimeter unter die Kanten der Glasplatten eingefüllt und vorsichtig mit 2 ml H₂O überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wurde das Wasser entfernt und das Sammelgel mit folgender Zusammensetzung auf das Trenngel gegossen:

Sammelgel: 1,25 ml 30%ige Acrylamid-Lösung
 1,25 ml 1M Tris-HCl, pH 6,8
 7,4 ml H₂O
 100 µl 10% SDS
 50 µl 10% APS
 20 µl TEMED

In das noch flüssige Trenngel wurde ein Kamm eingeschoben, der nach Polymerisation, Einsetzen der Gelapparatur in die Elektrophoresekammer und Einfüllen des Proteingel-puffers wieder entfernt wurde. Die somit entstandenen Auftrage-taschen wurden vor Beladung mit den Proteinproben mit Puffer ausgespült. Die Elektrophorese pro Gel erfolgte bis zur Sammlung der Proteine an der Grenze zum Trenngel bei 30 mA, im Trenngel bei 40 mA. Bei einer Elektrophorese über Nacht wurde 8 mA angelegt. Als Marker diente ein ¹⁴C-methylierter Proteinmarker (Amersham).

Im Anschluss an die Elektrophorese wurde das Gel fixiert (30 Min. Entfärber), gewässert (30 Min.) und im Geltrockner (3 Std.) getrocknet.

Die Analyse der Gele erfolgte mit einem Phosphor-Imager. Dazu wurden die Gele für 24 Std. an eine spezielle Imager-Platte angelegt und diese anschließend mit einem Phosphor-Imager gescannt und ausgewertet.

3.7 Analyse der viralen RNA-Synthese

Die Wirkung von mAK K41 auf die RNA-Synthese CDV-infizierter Vero-Zellen wurde sowohl in den ersten 12 Std. nach Infektion, als auch im Zeitraum von 12 bis 24 Std. nach Infektion untersucht. Im ersten Fall wurden Vero-Zellen in Suspension mit CDV OND-LP (MOI = 0,5; 1 Std. bei 37°C) infiziert, einmal mit Medium gewaschen und pro Ansatz 3×10^6 Zellen in 250 ml Kulturflaschen ausgesät. mAK K41 (12 µg/ml) wurde direkt nach der Aussaat zugegeben. Die RNA wurde 0, 6 und 12 Std. nach Infektion wie in 3.5.1 beschrieben isoliert. Im zweiten Versuchsansatz wurden die Zellen mit CDV (OND-LP) unter Verwendung einer MOI von 0,1 infiziert. FIP (300 µg/ml) allein, mAK K41 (12 µg/ml) allein oder eine Kombination von beiden Substanzen wurden dann 12 Stunden nach Infektion den Kulturen zugegeben. Die Isolierung von RNA erfolgte ebenfalls wie in 3.5.1 geschildert 6, 12, 18 und 24 Stunden nach Infektion.

Der RNA-Gehalt der Proben wurde im Photometer gemessen und auf einem Agarosegel (5µl Probe/Spur) überprüft. Die isolierten RNA-Proben wurden dann nach Auftrennung in einem 15%igen Agarosegel auf Hybond N Filter geblotted und mit ^{32}P -markierten Sonden für CDV-N und GAPDH hybridisiert.

3.7.1 Random Priming

Die ^{32}P -markierten DNA-Sonden für die Hybridisierung wurden mittels Random-Priming aus dem CDV-N- und dem GAPDH-Fragment (siehe 3.4.5) hergestellt. Dazu wurden die DNA-Fragmente 10 Min. bei 95°C denaturiert, dann auf Eis gestellt. Die Random-Priming-Ansätze wurden dann wie folgt zusammenpipettiert:

- 5 µl H₂O
- 2 µl Fragment (ca. 100 ng)
- 3 µl dNTP-Mix (dA dG dT aus dem Boehringer Kit)
- 2 µl Reaktionspuffer
- 5 µl ^{32}P -dCTP
- 2 µl Klenow Polymerase (5 U)

Inkubation für 30 Min. bei 37°C (Abschirmen !), anschließend Zugabe von:

- 70 µl TE
- 10 µl 3 M NaOAc pH 5,2

Danach erfolgt die Fällung der ^{32}P -markierten DNA-Sonden durch Zugabe von 250 µl eiskaltem 98%igem Ethanol und Inkubation bei -20°C über Nacht. Die DNA wurde dann durch 15 Min. Zentrifugation (12000 rpm) pelletiert und kurz getrocknet, um anschließend in 100 µl Hybridisierungspuffer gelöst zu werden. 1 µl der Lösung wurde abgenommen und im Czerenkov-Counter die Aktivität bestimmt, die für 100 µl bei $2 - 5 \times 10^7$ cpm liegen sollte.

3.7.2 RNA-Diffusions-Blot

Für die Analyse der viralen RNA-Synthese wurden die isolierten RNA Proben auf ein 15%iges Agarose-Gel aufgetragen (ca. 15-20 µl RNA-Probe/Spur):

RNA-Gel (100ml): 73 ml H₂O + 1,5 g Agarose aufkochen (2x)
 auf ca. 60 °C abkühlen lassen, unter Abzug mischen:
 + 10 ml 10x MOPS
 + 17 ml 37%iges Formaldehyd

Vor Auftragen der Proben (ca. 5 µg RNA) wurden diese im Verhältnis 1+3 mit Probenpuffer (50% Formamid (99%), 15% Formaldehyd (37%), 10% 10x MOPS, und 10% 10x Farbpuffer) gemischt, 15 Min. bei 60°C denaturiert, dann auf Eis abgekühlt. Das Gel wurde dann standardmäßig mit MOPS als Laufpuffer bei 8 V/cm (~100 V) 10 cm weit laufen gelassen. Vor dem Diffusionsblot wurde das Gel 20 Min. in RNA I (50 mM NaOH, 10 mM NaCl) denaturiert, 20 Min. in RNA II (0,1 M Tris pH 7,5) neutralisiert und 10 Min in 20x SSC equilibriert. Über Nacht wurde das Gel auf einen Diffusionsblot mit 20x SSC aufgelegt und auf Hybond N geblottet. Nach dem Blot wurde die Folie mit 2x SSC kurz gewaschen, um Salz zu entfernen und getrocknet. Das Crosslinken der RNA auf die Folie erfolgte durch Bestrahlung mit UV-Licht (0,6 J/cm²), wodurch die Folie bis zur Hybridisierung lagerfähig wird.

3.7.3 Hybridisierung von Northern-Blots:

Für die Hybridisierung der Blots mit den radioaktiv markierten Sonden wurde die Hybridisierungslösung für 30 Min. bei 70°C denaturiert, auf Eis kurz abgekühlt, aber nur auf ca. 40°C. Die Hybond-N Folie wurde mit 0,2 x SSC angefeuchtet, in einen Hybridisierungszylinder gegeben, die Hybridisierungslösung zugefügt und über Nacht bei 45°C im vorgeheizten Hybridisierungssofen vorhybridisiert.

Die radioaktive Probe (DNA: Random Priming markiert) wurde in 100 µl Hybridisierungspuffer bei 70°C für 30 Min. denaturiert, in die Vorhybridisierungslösung pipettiert und der Blot 24 Std. bei 45°C hybridisiert. Anschließend wurde der Blot aus der Lösung genommen, in 0,2 x SSC, 0,1% SDS gelegt und 1x 15 Min. bei RT, sowie 2x 30 Min. bei 65 °C gewaschen (alle radioaktiven Waschlösungen sammeln und zum radioaktiven Abfall geben!). Zum Schluß wurde der Blot bei RT in 0,2 x SSC gelegt und dann getrocknet. Der trockene Blot wurde auf ein Filterpapier mit Thesa festgeklebt, mit Haushaltsfolie abgedeckt und für 2 Tage in eine Phosphorimager-Kassette gelegt.

Die Analyse der Blots erfolgte dann mit dem Phosphor-Imager, wobei das CDV-N und das GAPDH-Signal quantitativ erfaßt wurde. Das Ausmaß der RNA-Synthese in einem Ansatz wurde anhand des Verhältnisses des CDV-N-Signals zum GAPDH-Signal der jeweiligen Probe bestimmt.

3.8 Fusions-Assays

Für die Untersuchung der Fusion von persistent mit CDV infizierten HeLa-Zellen mit uninfizierten HeLa-Zellen in An- und Abwesenheit von mAK K41 wurden die Zellen mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gefärbt. 4×10^4 uninfizierte Zellen in 100 μ l Medium wurden jeweils auf 12 mm Coverslips in 4-Clusterplatten ausgesät und nach kurzer Inkubation im Brutschrank weitere 400 μ l Medium dazugegeben. Nach Inkubation bei 37°C über Nacht wurden die Zellen abhängig von der Versuchsvorgabe mit R18-Rhodamin, Hoechst H33258 oder mit einer Kombination beider Farbstoffe gefärbt. Eine 10 mM Stocklösung von R18-Rhodamin wurde dazu 1:10 im serumfreiem Medium vorverdünnt. Pro Coverslip wurde 1 μ l des verdünnten R18 und/oder 3 μ l der Hoechst H33258-Farbstoffes (0,1 g/l in Methanol) dem Medium beigelegt. Anschließend wurden die Ansätze 15 Min. bei 37°C inkubiert und danach dreimal mit serumfreiem Medium gewaschen. Die Ansätze wurden dann mit 500 μ l MEM + 5% FKS versorgt und nach Zugabe von mAK K41 (12 μ g/ml), W6/32 (10 μ g/ml) oder mAK 8D1/B3 (10 μ g/ml) 1 Std. im Brutschrank inkubiert. Nach dieser Inkubationszeit wurden in Anwesenheit der Antikörper pro Coverslip 1×10^4 gefärbte, persistent infizierte HeLa-Zellen hinzugefügt.

Die Färbung der persistent infizierten HeLa-Zellen mit R18, Calcein oder einer Kombination beider Farbstoffe erfolgte vor Zugabe zu den uninfizierten Zellen. Dazu wurden 1×10^6 persistent infizierte Zellen in 15 ml Falcon-Röhrchen einmal mit serumfreiem Medium gewaschen und in 5 ml Medium -FKS aufgenommen. Für eine Färbung mit Rhodamin wurden dann 2 μ l der 10 mM Stocklösung und/oder für die Calcein-Färbung 5 μ l Calcein-Stocklösung (50 μ g Calcein in 10 μ l DMSO) zugegeben. Mit dem Vortexer wurden die Zellen kurz gemischt, in Alufolie gewickelt und 15 Min. bei 37°C unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Abschließend wurden dreimal mit je 10 ml Medium + FCS gewaschen, wobei die Zellen jedesmal in ein neues Röhrchen überführt wurden (ungebundenes R18 lagert sich an Röhrchen an). Während der Färbung sollte möglichst dunkel (Alufolie) gearbeitet werden.

Nach Zugabe von 1×10^4 der gefärbten infizierten Zellen (in ca. 100 μ l Medium) zu den uninfizierten Zellen wurden die Coverslips zuerst 20 Min. auf 4°C inkubiert, um ein Absetzen der infizierten Zellen ohne einen gleichzeitigen Beginn der Zell-Zell-Fusion zu ermöglichen. Danach wurden die Zellen für die restliche Dauer der Fusionsexperimente bei 37°C kultiviert. Zu verschiedenen Zeiten nach der Zugabe der infizierten Zellen zu den uninfizierten Zellen wurde die Zell-Zell-Fusion im Fluoreszenzmikroskop untersucht. Dazu wurden die Coverslips einmal mit PBS gewaschen und die Coverslips ohne Fixierung der Zellen auf einen Objektträger mit ca. 20 μ l Molviol als Einbettmedium gelegt. Für die Untersuchung im Fluoreszenzmikroskop wurden ein TX-Filter (R18), L5-Filter (Calcein) und A-Filter (Höchst-Farbstoff) eingesetzt, sowie für Fotografien ein Diafilm mit 400 ASA verwendet.

Eine etwas abgewandelter Fusionsassay wurde herangezogen um zu klären, ob der Fusionshemmende Effekt von mAK K41 nur auf die uninfizierten oder auf die infizierten Zellen wirkt. Dazu wurden je 5×10^5 uninfizierte HeLa-Zellen pro Napf einer 6-Clusterplatte ausgesät

und 3 Std. zur Adhärenz bei 37°C inkubiert. Danach wurden die entweder unbehandelt gelassen, oder für eine Stunde mit mAK K41 (12 µg/ml) inkubiert. Anschließend wurde zur Entfernung nichtgebundenen Antikörpers zweimal mit Medium gewaschen. Persistent infizierte HeLa-Zellen wurden in Suspension ebenfalls für eine Stunde entweder mit mAK K41 (12 µg/ml MEM für 5×10^5 Zellen) vorinkubiert oder unbehandelt gelassen und ebenfalls zweimal mit MEM gewaschen. Dann wurden nach folgendem Schema die unterschiedlich behandelten uninfizierten und persistent infizierten Zellen im Verhältnis 1+1 gemischt: Uninfizierte und infizierte Zellen die nicht mit mAK K41 behandelte waren, Ansätze bei denen entweder die uninfizierten oder die infizierten Zellen mit K41 vorinkubiert waren und Ansätze bei denen beide Zellpopulationen mit mAK K41 vorinkubiert worden waren. Nach 15 Stunden wurden von jedem der Ansätze vier zufällig ausgewählte Bereiche der Zellkultur im Lichtmikroskop abfotografiert. Die Fotografien wurden dann mittels eines Scanners in einen Computer eingelesen. Anschließend wurde die jeweilige Fläche des Zellkultur-Fotos, die von Synzytien eingenommen wurde, mit Hilfe eines Bildauswertungsprogrammes (NIH-Image Graphics Software) am Computer vermessen. Für die Auswertung wurden dabei nur deutlich sichtbare Synzytien mit drei und mehr Nuclei zur Vermessung herangezogen.

4. Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der CD9-Expression an der Zelloberfläche und ihrer Bedeutung für die Virusbindung und die Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien

CD9 konnte nicht als Rezeptor für CDV identifiziert werden. Es stellte sich die Frage, ob CD9 mit dem eigentlichen CDV-Rezeptor assoziiert ist oder eventuell als Korezeptor dient. In diesem Falle sollte eine Korrelation zwischen der Expression von CD9 und der Virusbindung, bzw. der Infizierbarkeit bestehen. Ein bei einigen Viren beobachtetes Phänomen ist auch, dass zelluläre Rezeptoren für Viren nach einer Infektion von der Zelloberfläche herabreguliert werden um Mehrfachinfektionen zu verhindern. Deshalb sollte getestet werden, ob eine CDV-Infektion ebenfalls zu einer Herabregulierung von CD9 führt.

4.1.1 Korrelation von CD9-Expression und Virusbindung

Im Durchflußzytometer wurde die CD9-Expression auf der Oberfläche verschiedener adhären oder in Suspension wachsender Zelllinien gemessen. Dazu wurden die Zellen mit dem anti-CD9-Antikörper K41 inkubiert und gebundenes K41 mit einem Fluorescein-Isothiocyanat gekoppeltem Sekundärantikörper detektiert. Im FACS wurde dann die mediane Fluoreszenzintensität der Zellen und der Prozentsatz an CD9-positiven Zellen in der Probe ermittelt (Abb. 4.1 A).

Die Bindung von CDV-Partikeln (Stamm OND-LP) an die verschiedenen Zelllinien wurde ebenfalls im Durchflußzytometer gemessen. Die Zellen wurden mit CDV (MOI = 10) inkubiert und gebundene Viruspartikel mit einem polyklonalen Hunde-Hyperimmun-Serum gegen CDV nachgewiesen. Die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen diente dann zur Berechnung des Bindungskoeffizienten. Der Bindungskoeffizient ergibt sich aus dem Quotient der MFI von mit Virus inkubierten Zellen und unbehandelten Zellen (Abb. 4.1 B).

Abbildung 4.1 A zeigt, dass es sowohl bei den adhären, als auch bei den Suspensions-Zelllinien deutliche Unterschiede in der Expression des von K41 erkannten CD9-Epitopes an der Zelloberfläche gab. Während von den adhären Zellen Vero, HeLa und LoVo eine sehr gute Expression zeigten, waren CHO, CHO 5.3 und B95a nur gering bis nicht CD9-positiv. Bei den Suspensions-Zelllinien wiesen nur DH82 und BJAB eine deutliche CD9-Expression auf. Wie man allerdings aus der Abbildung 4.1 B entnehmen kann, korrelierte die Bindung des CDV-Stammes OND-LP an die Zellen nur im Falle von Vero und HeLa mit der CD9-Expression. Bei allen anderen Zelllinien ist war keine Korrelation von Virusbindung und CD9-Menge an der Zelloberfläche festzustellen. Die Suspensions-Zelllinien zeigten keine, oder im Fall von DH82 nur eine geringe Bindung des Virus, obwohl DH82 und BJAB deutlich CD9-positiv waren. Bei den adhären Zellen konnte für die CHO-Linien und B95a dagegen trotz

geringer CD9-Expression eine sehr gute Virusbindung beobachtet werden. Die adhärennten Zelllinien zeigten also unabhängig von CD9 eine deutliche Virusbindung, wogegen die Suspensionszellen keine Bindung aufwiesen.

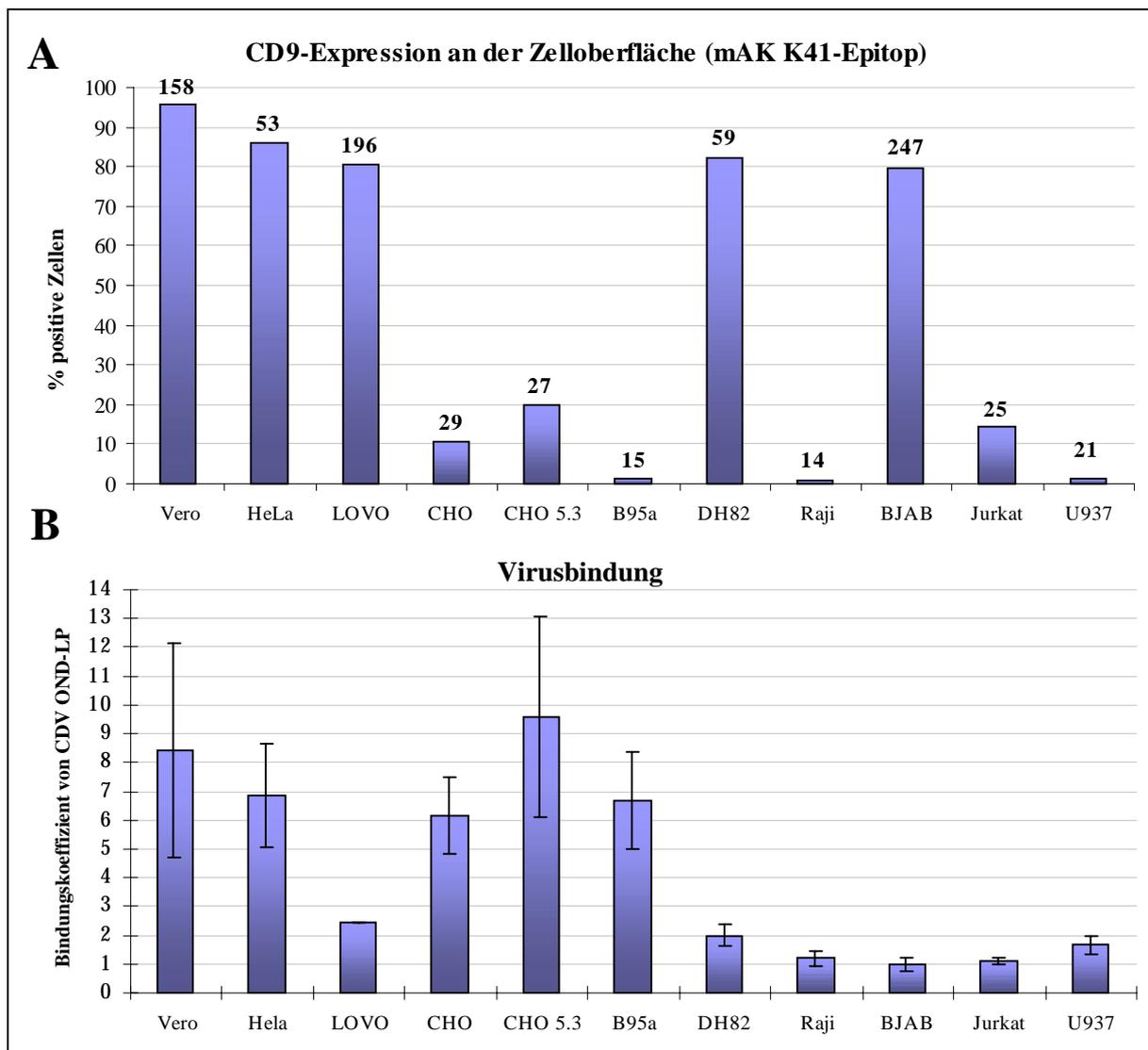


Abb. 4.1: Vergleich von CD9-Expression und Virusbindung. A) Verschiedene Zelllinien wurden mit $1\mu\text{g}$ mAK K41 eine Stunde bei 4°C inkubiert. Gebundener K41 wurde mit einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert und im FACS der Anteil der CD9-positiven Zelle und die mediane Fluoreszenzintensität (über den jeweiligen Balken angegeben) bestimmt. B) Zur Ermittlung der Virusbindung wurden 2×10^4 Zellen bei 4°C für eine Stunde mit einer CDV-MOI von 10 (Stamm OND-LP) inkubiert. Anschließend wurde ungebundenes Virus abgewaschen und die Bindung durch eine Färbung mit einem polyklonalen Hunde-Hyperimmun-Serum gegen CDV überprüft. Im Durchflußzytometer wurden die mediane Fluoreszenzintensität (MFI) der Zellen gemessen und der Bindungskoeffizient berechnet. Dieser ergibt sich aus dem Quotienten der MFI von mit Virus inkubierten und nicht inkubierten Zellen. In (B) sind die Mittelwerte der Bindungskoeffizienten von 3-6 Experimenten dargestellt.

Neben dem CDV-Stamm OND-LP wurden auch die Bindungskoeffizienten für die CDV-Stämme OND-SP, A75/17-V, Rockburn und Dog/NI bestimmt. Wie Abbildung 4.2 zeigt, ergab sich für diese Stämme ein ähnliches Bild wie für CDV OND-LP. Die Bindungskoeffizienten für adhärennte Zellen lagen größtenteils deutlich über 2, während von den Suspensionszellen nur DH82 eine deutliche Bindung von Virus nachzuweisen war. Die Bindungs-

koeffizienten der einzelnen Stämme zeigten zwar für die jeweilige Zellart gewisse Schwankungen, aber es waren keine signifikanten Unterschiede im Bindungstropismus der CDV-Stämme feststellbar.

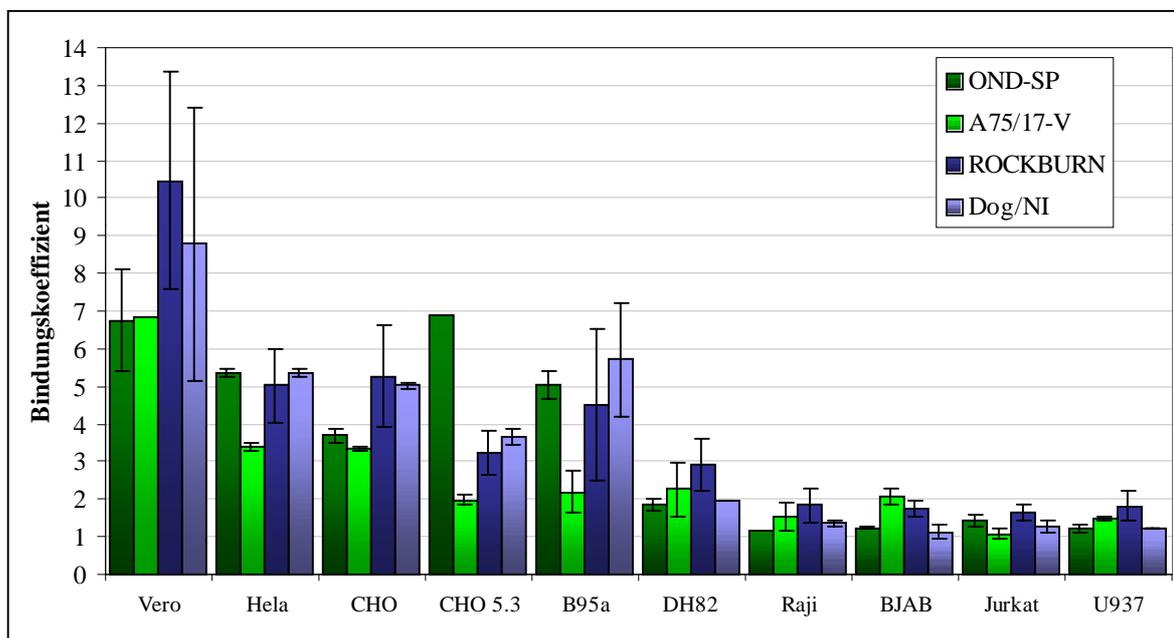


Abb. 4.2: Bindungskoeffizienten verschiedener CDV-Stämme an unterschiedliche Zelllinien. Je 2×10^4 Zellen wurden bei 4°C für eine Stunde mit verschiedenen CDV-Stämmen ($\text{MOI}=10$) inkubiert. Nach zweimaligem Waschen wurde gebundenes Virus mit einem polyklonalen Hunde-Hyperimmun-Serum gegen CDV detektiert. Nach Messung der medianen Fluoreszenzintensität im Durchflußzytometer wurden der jeweilige Bindungskoeffizient berechnet.

4.1.2 Korrelation von Virusbindung und Infizierbarkeit

Nachdem sich keine Korrelation zwischen CD9-Expression und Virusbindung gezeigt hatte, wurde untersucht, ob Virusbindung und Infizierbarkeit der Zellen zusammenhängen. Dazu wurden die Zellen mit den CDV-Stämmen ($\text{MOI} = 0,1$) eine Stunde bei 37°C inkubiert. 4 Tage nach Infektion wurde dann mit einem polyklonalen Serum gegen CDV im Durchflußzytometer kontrolliert, ob die Zellen virale Antigene exprimieren. In Tabelle 4.1 sind die Ergebnisse dieser Infektionstest dargestellt.

Für die adhärennten Zelllinien korrelierte die Virusbindung und die Infizierbarkeit recht gut. Dabei waren die Zellen vor allem mit den beiden Onderstepoort-Stämme OND-LP und OND-SP sehr gut zu infizieren. Die Infektion mit A75/17-V fiel dagegen schwächer aus, ebenso wie die Rockburn oder Dog/NI-Infektion. Letztere konnten auch nicht LoVo-Zellen infizieren.

Bei den Suspensionszellen bestand keine Korrelation zwischen Bindung und Infizierbarkeit, da z.B. Raji-Zellen keine Virusbindung zeigten, aber trotzdem mit Rockburn und Dog/NI infizierbar waren. Noch deutlicher ist das Beispiel der Jurkat-Zellen, die mit allen CDV-Stämmen z.T. sehr gut infizierbar waren, obwohl sie bei keinem Virusstamm eine signifikante Virusbindung aufwiesen.

Bei den Infektionstests zeigten sich Unterschiede zwischen den CDV-Stämmen bezüglich der Infektiösität und der Ausbildung zytopathischer Effekte (CPE). Die Stämme OND-LP, OND-SP und A75/17-V führten in fast allen infizierbaren Zellen zu einer Zell-Zell-Fusion und somit zur Bildung von Synzytien oder Riesenzellen (Jurkat). Bei den Stämmen Rockburn, Dog/NI und dem hier nicht aufgeführten HAN 2544/90 waren dagegen bei keiner infizierten Zellkultur Anzeichen für eine Synzytienbildung zu beobachten.

Zelllinie	Infizierbarkeit der Zellen mit					Synzytienbildung
	OND-LP	OND-SP	A75/17-V	Rockburn	Dog/NI	
Vero	+++	+++	+++	+++	+++	Ja, außer RB, Dog/NI
HeLa	+++	+++	+++	++	++	Ja, außer RB, Dog/NI
LoVo	++	++	++	-	-	Nein
CHO	+++	+++	++	++	++	Nein
CHO 5.3	++	+++	++	++	++	Nein
B95a	+++	++	+	++	+	Ja, außer RB, Dog/NI
DH82	++	+	-	+	-	Ja, außer RB
Raji	-	-	-	++	++	Nein
BJAB	+	-	-	-	-	Nein
Jurkat	+++	+++	+++	++	++	Ja, außer RB, Dog/NI
U937	-	-	-	-	-	Nein

Tabelle 4.1: Infizierbarkeit verschiedener Zelllinien mit diversen CDV-Stämmen. Die Zellen wurden eine Stunde bei 37°C mit einer MOI von 0,1 inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit frischem Medium für 4 Tage kultiviert. Zum Nachweis einer Infektion wurden die Zellen permeabilisiert und virale Proteine mit einem polyklonalen Serum gegen CDV detektiert. Im Durchflußzytometer wurde dann die Anzahl der Zellen bestimmt, die virale Antigene exprimierten. Die Infizierbarkeit der Zellen wurde nach folgendem Schlüssel bewertet: „-“ = keine positiven Zellen; „+“ = Anzahl positiver Zellen ≤ 10%; „++“ = Anzahl positiver Zellen 10 - 40% und „+++“ = Anzahl positiver Zellen > 40%. Zusätzlich ist in der Tabelle angegeben, ob bei infizierten Zellen ein CPE in Form einer Synzytienbildung zu beobachten war.

4.1.3 Regulation des K41-Epitops auf uninfizierten und CDV-infizierten Vero-Zellen

Einige viralen Infektionen bewirken *in vitro* eine Herabregulierung des Virusrezeptors von der Oberfläche der Wirtszelle. Als weiterer Test für Rezeptoreigenschaften von CD9 bei der CDV-Infektion wurde untersucht, ob im Laufe einer Infektion CD9 ebenfalls von der Zelloberfläche herabreguliert wird. Dazu wurde das CD9-Signal auf infizierten und uninfizierten Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten (6-36 Stunden nach Infektion) im Durchflußzytometer gemessen.

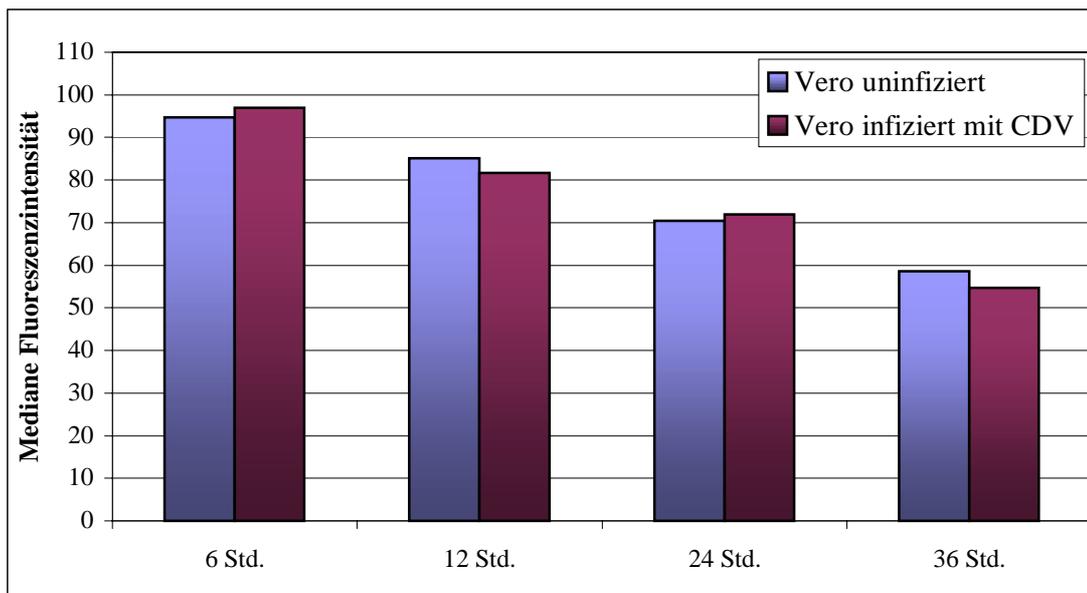


Abb. 4.3: Regulation von CD9 auf der Oberfläche infizierter und uninfizierter Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit CDV OND-LP (MOI=0,01) infiziert oder unbehandelt gelassen und anschließend in 12-Clusterplatten ca. 80% konfluent ausgesät. Nach 6, 12, 24 und 36 Stunden Kultivierung wurden die Zellen geerntet und die CD9-Menge auf der Oberfläche mit Hilfe des mAK K41 im FACS gemessen. In der Grafik ist die mediane Fluoreszenzintensität der Zellen im Verlauf von 36 Stunden dargestellt (n=2).

Wie Abbildung 4.3 zeigt, bestand zu keinem Zeitpunkt ein signifikanter Unterschied in der CD9-Oberflächenexpression zwischen den infizierten und den uninfizierten Zellen. Dies war ein weiterer Anhaltspunkt dafür, dass CD9 nicht der Rezeptor für CDV ist. Es kam aber in beiden Fällen im Verlauf des Experiments zu einer Reduzierung des CD9 auf den Zellen. Dies ist wahrscheinlich auf kontakt-induzierte Herabregulierung zurückzuführen. Da durch das Zellwachstum der Platz der einzelnen Zelle in der Kultur ständig abnimmt, verringert sich auch die Zelloberfläche und Membranproteine wie das CD9 können internalisiert oder ins Medium abgegeben werden.

4.1.4 Wirkung des anti-CD9-Antikörpers K41 auf die Proliferation von Vero-Zellen

Es ist bekannt, dass die Zugabe bestimmter monoklonaler Antikörper zum Kulturmedium von Zellkulturen Auswirkungen auf die Proliferation der Zellen haben kann. Deshalb wurde überprüft, ob die Hemmung der Hundestaupe-Infektion eventuell auf einer proliferationshemmenden Wirkung des Antikörpers K41 beruht. Im Rahmen eines Proliferationsassays wurde nach verschiedenen Zeiten der Einbau von ^3H -Thymidin in Vero-Zellen gemessen, die in K41-freiem oder K41-haltigen Medium kultiviert wurden.

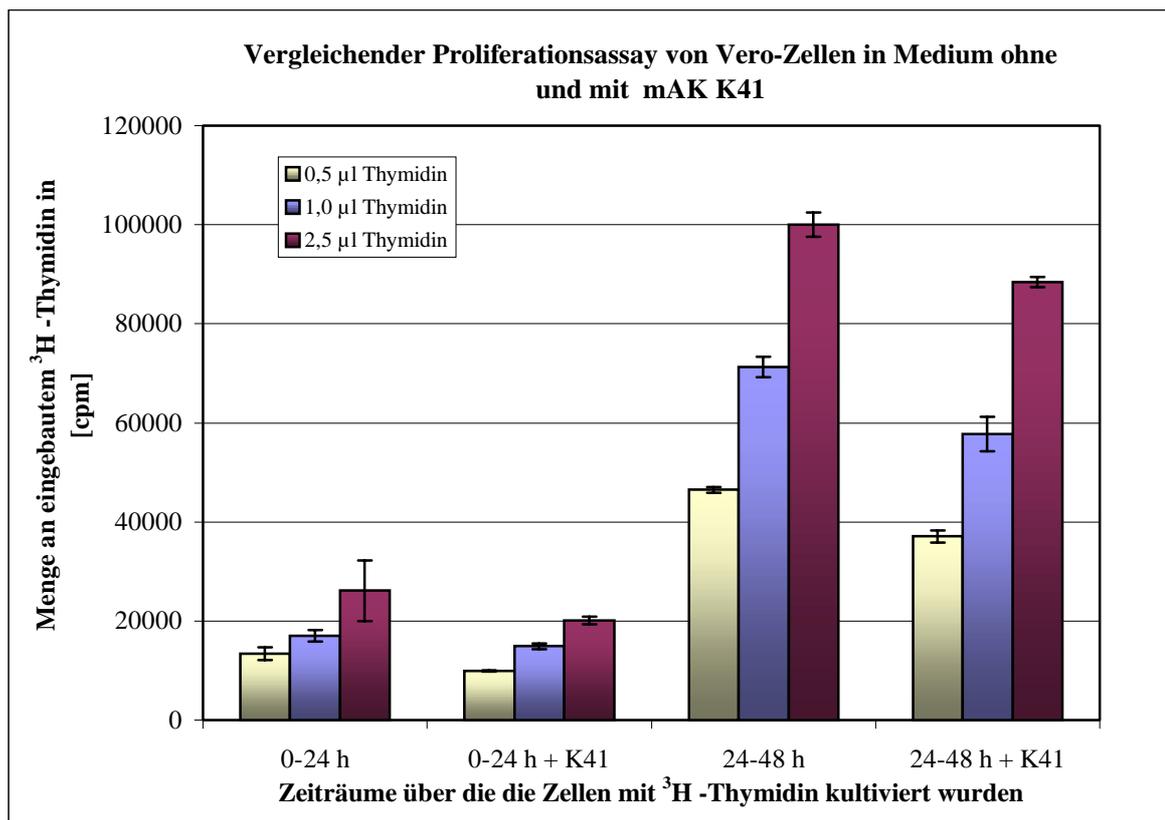


Abb. 4.4: Wirkung von mAK K41 auf die Proliferation von Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden in 96-Napf-Platten ausgesät und zum Teil mit K41-haltigem Medium versorgt (12 µg mAK K41/ml). Dem Kulturmedium wurde ³H-Thymidin entweder zu Beginn der Zellkultivierung oder zeitlich um 24 Std. versetzt beigemischt. Die Zellen hatten dann 24 Std. Zeit das markierte Thymidin einzubauen. Nach Ablauf dieser Zeit wurden die Zellen im Harvester geerntet und der Thymidineinbau mit einem Flüssigkeits-Szintillationszähler bestimmt.

Untersuchung der Zellkulturen im Lichtmikroskop ließen zwischen K41-behandelten und unbehandelten Vero-Zellen keine auffallenden morphologischen Unterschiede erkennen und es gab keine Anzeichen für abgestorbene oder kranke Zellen. Die Meßdaten des Proliferationsassays (Abb. 4.4) ergaben, dass eine Konzentration von 12 µg mAK K41 im Zellkultur-Medium bei Vero-Zellen zu einer leichten Hemmung der Proliferation von 10 - 15% führte. Dieser Effekt auf das Zellwachstum ist aber zu gering, um als Ursache für die beobachtete starke Hemmung der CDV-Infektion durch anti-CD9-Antikörper in Frage zu kommen.

4.2 Anti-CD9-Antikörper beeinflussen weder die Bindung von CDV an die Zielzelle noch die anschließende Virusaufnahme

Der erste Schritt einer jeden viralen Infektion ist die Bindung des Virus an die Wirtszelle und sein anschließendes Eindringen in die Zelle. Zwar war keine direkte Bindung von CDV an CD9 nachweisbar, jedoch ist dies nicht ausreichend um eine generelle Beteiligung des CD9 an diesen Vorgängen als Korezeptor oder Kofaktor auszuschließen. Es musste deshalb untersucht werden ob anti-CD9-Antikörper Einfluß auf die Virusbindung und die Aufnahme des CDV-Virions haben.

4.2.1 CD9-Antikörper hemmen nicht die Bindung von CDV an Vero-Zellen

Um zu testen, ob die Bindung von CDV an die Zielzelle und somit die Infektion an sich durch CD9-Antikörper gehemmt wird, wurden Virusbindungstests durchgeführt und im Durchflußzytometer ausgewertet. In vorhergehenden Versuchen hatte sich gezeigt, dass bereits eine Behandlung von Zellen mit mAK K41 in einer Konzentration von 15 $\mu\text{g/ml}$ zu einer Hemmung der Synzytienbildung von 80-98% führt. Im Virusbindungstest wurden Vero-Zellen mit einer sättigenden K41-Konzentration (100 $\mu\text{g/ml}$) eine Stunde vorinkubiert und anschließend mit CDV OND-LP (MOI=10) für eine Stunde bei 4°C inkubiert. Gebundenes Virus wurde mit einem Hunde-Hyperimmun-Serum gegen CDV im Durchflußzytometer gemessen (Abb. 4.5 A) und die mittlere Fluoreszenzintensität der Signale in Abwesenheit und Gegenwart von mAK K41 verglichen (Abb. 4.5 B).

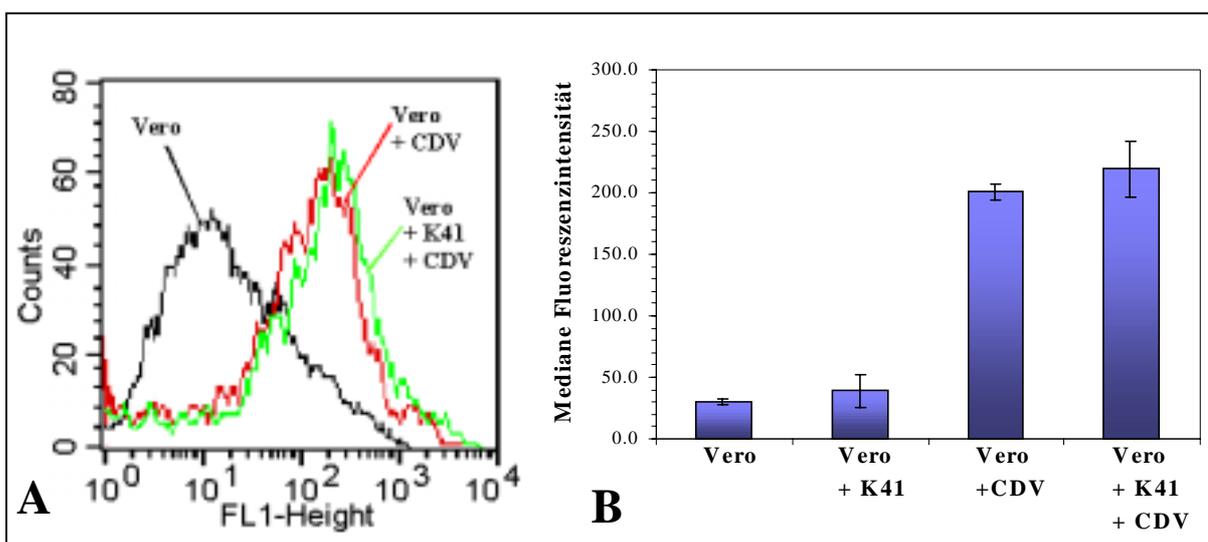


Abb. 4.5: Wirkung von Anti-CD9-Antikörpern auf die Bindung von CDV an Zellen. Der CDV-Stamm OND-LP wurde bei 4°C an Vero-Zellen gebunden und gebundenes Virus im Durchflußzytometer mit einem polyklonalen Hunde-Hyperimmun-Serum detektiert (A). Gebundenes Virus verschiebt das Signal vom Hintergrundwert (Vero) hin zu höheren Werten der mittleren Fluoreszenzintensität (Vero + CDV). Vorinkubation mit mAK K41 (100 $\mu\text{g/ml}$) blockiert die Bindung von Virus nicht und liefert ähnliche Signale wie Virus alleine (Vero + K41 + CDV). Die Mittelwerte der medianen Fluoreszenz-Intensität von drei Bindungstests in An- und Abwesenheit von mAK K41 sind in Abbildung B dargestellt.

Wie man an Abbildung 4.5 sieht, hatte der mAK K41 keinen Einfluß auf die Bindung der viralen Partikel an Vero-Zellen, da die Meßkurven für die Virusbindung mit und ohne K41 sind nahezu identisch waren. Ähnliche Resultate ergaben sich auch für Bindungstests mit anderen Hundestaube-Stämmen wie OND-SP, A75/17-V, RB und Dog/NI (Abb. 4.6). Da sich gezeigt hatte, dass unter physiologischen Bedingungen in der Regel eine stärkere Virusbindung meßbar war, erfolgte die Inkubation mit Virus bei diesen Versuchen bei 37 °C. Aber auch in diesen Experimenten war keine Störung der Virusbindung durch CD9-Antikörper festzustellen. Somit wurde bei keinem der verwendeten CDV-Stämme die Anheftung der Viruspartikel an die Wirtszelle durch anti-CD9-Antikörper gehemmt.

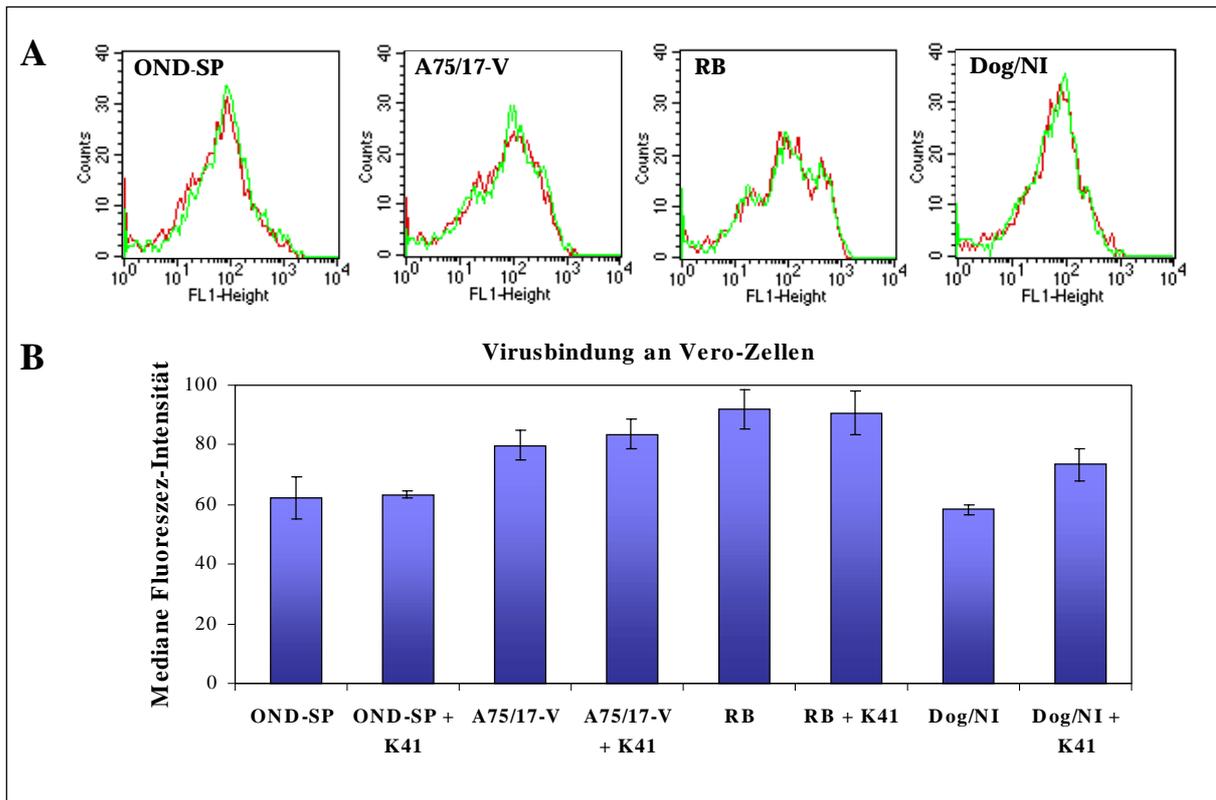


Abb. 4.6: Wirkung von Anti-CD9-Antikörpern auf die Bindung von verschiedenen CDV-Stämme an Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit Virus verschiedener Stämme (MOI=5) für 45 Minuten bei 37°C inkubiert und gebundenes Virus anschließend mit einem polyklonalen Hunde-Hyperimmun-Serum im Durchflußzytometer nachgewiesen (Rote Kurven =Virusbindung an unbehandelte Zellen; grüne Kurven = Virus-bindung an mit mAK K41 (100 µg/ml) vorinkubierte Zellen). B) zeigt die Mittelwerte der medianen Fluoreszenzintensität dreier Bindungsexperimente.

4.2.2 Die Aufnahme von CDV durch Vero-Zellen wird durch gegen CD9 gerichtete Antikörper nicht beeinflusst

Nach der Bindung des Virus folgt als nächster Schritt einer Infektion die Aufnahme des Virus in die Zelle, entweder durch pH-abhängige Endozytose oder, wie bei CDV, durch pH-unabhängige Fusion der Virushülle mit der Zellmembran. Die Aufnahme von Hundestaupevirus durch Vero-Zellen wurde mit Hilfe der RT-PCR gemessen. Für die reverse Transkription wurden Primer gewählt, die einen 1027 Nucleotide großen Bereich amplifizieren, der Teile des F- und H-Genes von CDV und die dazwischen liegende intergenomische Region beinhaltet. Durch diese Wahl der Primer konnte sichergestellt werden, dass in der Polymerase-Kettenreaktion (PCR) nur genomische virale RNA und nicht die virale mRNA nachgewiesen wurde. Aufgrund methodisch bedingter Schwankungen war es nicht möglich mit der RT-PCR quantitativ exakt die aufgenommene Virusmenge zu bestimmen. Um aber trotzdem semi-quantitative Ergebnisse zu erhalten, wurden die Vero-Zellen mit abnehmenden MOI's von CDV (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01) in Anwesenheit und Abwesenheit von mAK K41 infiziert. Nach 2 Stunden wurden die Zellen mit einem sauren Puffer behandelt, um außen anheftende

Viruspartikel zu zerstören. Anschließend wurde die gesamte zelluläre RNA isoliert (Abb. 4.7 RNA) und die RT-PCR mit den F/H-Primern angesetzt.

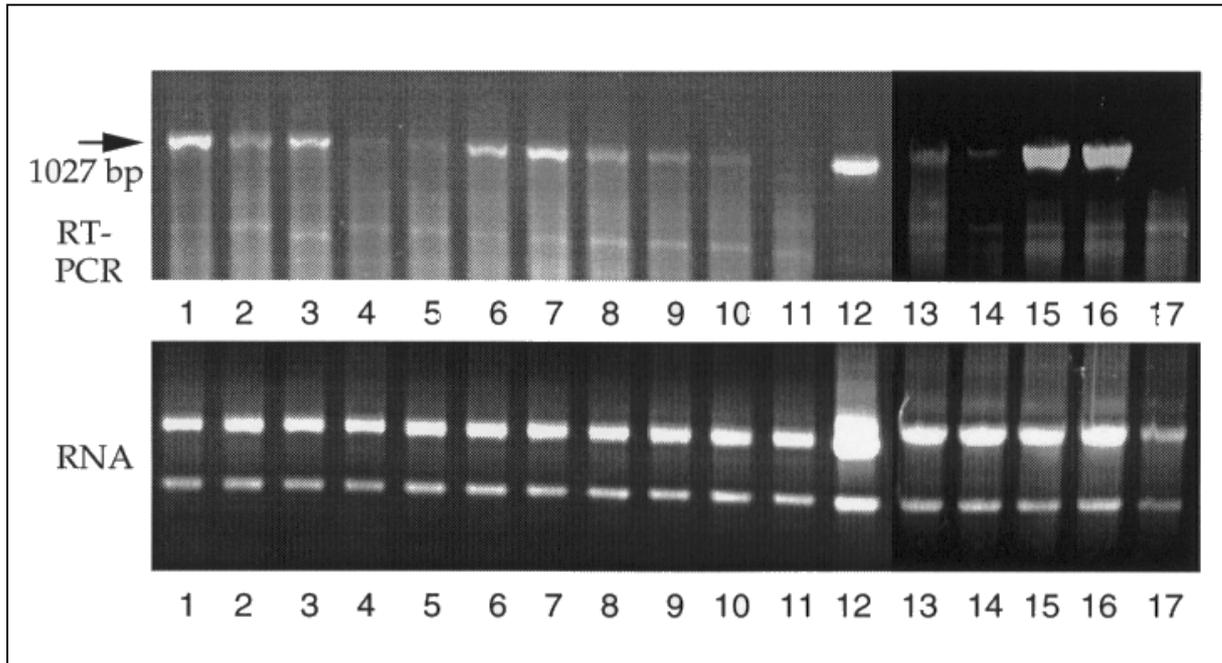


Abb. 4.7: Wirkung von anti-CD9-Antikörpern auf die Aufnahme von CDV durch Vero-Zellen. Um die CDV-Aufnahme mittels RT-PCR zu messen, wurden Vero-Zellen mit abnehmenden MOIs von CDV (1; 0,5; 0,1; 0,05; 0,01) in Abwesenheit (Spur 1 - 5) und Gegenwart von mAK K41 (Spur 6 - 10) infiziert. Als Negativ-Kontrolle (Spur 11, 17) diente RNA aus uninfizierten Zellen; die Positiv-Kontrolle (Spur 12) war RNA aus 24 h CDV-infizierten Vero-Zellen (MOI = 0.1). Im Kontroll-Versuch wurden Vero-Zellen mit CDV MOI 1 und 0,3 bei 4°C (Spur 13, 14) und bei 37°C (Spur 15, 16) 2 h inkubiert und dann mit saurem Puffer und PBS gewaschen. Für die reverse Transkription wurden für das CDV-Genom spezifische Primer verwendet. Die PCR mit diesen F/H-Primern amplifiziert ein 1027 bp Fragment zwischen Teilen des F- und H-Gens von CDV. Die für die RT-PCR verwendete RNA ist im unteren Gel zu sehen.

Wie in Abbildung 4.7 ersichtlich, wurden ähnliche Mengen des 1027 bp großen Fragments in Abwesenheit (Abb. 4.7, Spur 1 - 5) und Anwesenheit (Abb. 4.7, Spur 6 - 10) von mAK K41 synthetisiert. Die Virusaufnahme wurde also durch CD9-Antikörper nicht beeinträchtigt.

In einem Kontroll-Experiment wurde nachgewiesen, dass tatsächlich nur bereits aufgenommenes Virus durch die RT-PCR detektiert wird. Dazu wurden Zellen mit CDV MOI = 1 und 0,3 bei 4°C (Abb. 4.7, Spur 13, 14) and bei 37°C (Abb. 4.7, Spur 15, 16) 2 Stunden lang inkubiert und danach mit saurem Puffer und PBS gewaschen. Bei 4°C bindet Virus zwar an Zellen, die temperaturabhängige Virusaufnahme findet aber nicht statt. Somit war mit der RT-PCR auch keine genomische virale RNA nachweisbar. Im Gegensatz dazu wurden bei 37°C substantielle Mengen an Virus aufgenommen und durch die RT-PCR nachgewiesen.

4.3 Die Hemmung der CDV-Infektion durch anti-CD9-Antikörper erfolgt in einem Schritt nach der Virusaufnahme

Da sich gezeigt hatte, dass Antikörper gegen CD9 keinen Effekt auf die Virusaufnahme haben wurde untersucht, ob der mAK K41 nur vor, oder auch noch nach einer erfolgten Infektion eine hemmende Wirkung auf CDV hat.

4.3.1 Hemmeffekt von mAK K41 bei Zugabe nach erfolgter CDV-Infektion

Um zu testen, ob der mAK K41 auch nach der Infektion noch eine hemmende Wirkung auf die CDV-Infektion hat, wurden Vero-Zellen auf Lab-Tek-Coverslips ausgesät. Einzelne Ansätze wurden dann zu verschiedenen Zeitpunkten vor oder nach einer Infektion mit CDV (MOI 0,01 oder 0,005) mit dem anti-CD9-Antikörper K41 oder dem Kontroll-Antikörper 10/88 (anti-CD46-Antikörper) behandelt: Die Behandlung mit den Antikörpern (100 µg/ml) erfolgte dabei entweder 1 Std. vor, 1 Std. nach oder 16 Std. nach der Infektion. Dabei wurden die Zellen für eine Stunde mit den Antikörpern bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit neuem, antikörperfreiem Medium versorgt. 44 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit einem Hunde-Hyperimmun-Serum und FITC-konjugierten Sekundärantikörper gefärbt und der Versuch im Immunfluoreszenz-Mikroskop ausgewertet. Dazu wurde der Anteil der uninfizierten Zellen bestimmt, sowie die Größe und Anzahl der CDV-induzierten Synzytien beurteilt.

Bei der Auswertung des Versuchs zeigte sich folgendes: Die Größe der Plaques in allen mit K41 behandelten Ansätzen war um das 2-3 fache kleiner als die in den unbehandelten oder 10/88 behandelten Ansätzen. Überraschenderweise war dabei der Anteil an uninfizierten Zellen in den mit mAK K41 behandelten Ansätzen abhängig davon, zu welchem Zeitpunkt im Bezug zur Infektion die Antikörper-Behandlung erfolgte (Abb. 4.8): Die Hemmung der Infektion war am Höchsten, wenn die Zellen 1 Std. nach der Infektion mit K41 behandelt worden waren. Selbst wenn die Zellen erst 16 Std. nach erfolgter Infektion mit dem CD9-Antikörper inkubiert wurden waren mehr uninfizierte Zellen zu finden, als in Ansätzen die vor der Infektion mit K41 behandelt worden waren.

Dieser Befund ist ein weiterer Beweis dafür, dass die ersten Schritte der CDV-Infektion nicht von CD9-Antikörpern gehemmt werden, da sonst die höchste Anzahl uninfizierter Zellen in den Ansätzen zu finden sein müßte, die vor Infektion mit K41 inkubiert worden waren.

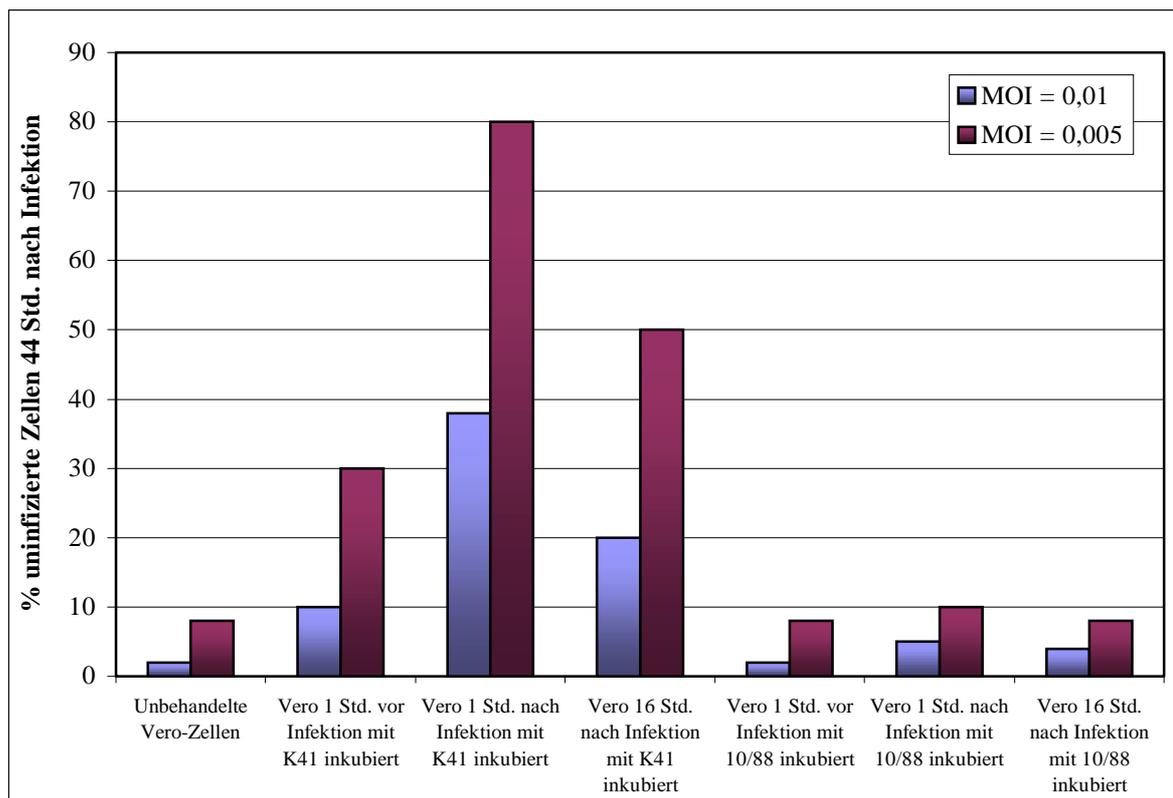


Abb. 4.8: Wirkung von mAK K41 auf bereits mit CDV infizierte Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit CDV infiziert (MOI = 0,01 oder 0,005). Die Zellen wurden zusätzlich zu verschiedenen Zeitpunkten vor, bzw. nach der Infektion 1 Std. mit dem CD9-Antikörper K41 oder dem CD46-Antikörper 10/88 inkubiert. 44 Stunden nach der Infektion wurden die Zellen dann mit polyklonalem Hunde-Hyperimmun-Serum gegen CDV und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper für die Auswertung mittels Immunfluoreszenz gefärbt. Im IF-Mikroskop wurde die Anzahl der uninfizierten Zellen bestimmt. In der Grafik ist der Prozentsatz an uninfizierten Zellen in den unterschiedlichen Ansätzen dargestellt.

4.3.2 Anti-CD9-Antikörper hemmen die CDV-Produktion in einem Schritt nach der Virusaufnahme

Der Befund, dass der mAK K41 Prozesse der CDV-Replikation hemmt, die nach der Virusaufnahme stattfinden, wird durch Experimente zur Messung der Virusproduktion unterstützt. Vero-Zellen wurden zu verschiedenen Zeitpunkten bezüglich der Infektion der Zellen mit mAK K41 behandelt (100 µg/ml): 1 Stunde vor oder 1 Stunde nach der Infektion der Zellen mit CDV OND-LP (MOI = 0,005). Die Dauer der K41-Behandlung betrug in beiden Fällen eine Stunde. Bis 72 Stunden nach Infektion wurde dann zu bestimmte Zeitpunkten das zellgebundene Virus und zellfreie Virus geerntet und auf Vero-Zellen titriert.

Die Abbildung 4.9 zeigt, dass unabhängig davon, zu welchem Zeitpunkt die Zellen mit mAK K41 behandelt wurden, die Virusproduktion deutlich reduziert wurde: Zellgebundenes Virus wurde zwischen 16 und 48 Stunden nach Infektion etwa um den Faktor 10 verringert, wobei zu späteren Zeitpunkten die Reduktion etwas schwächer ausfiel (Abb. 4.9 A). Der Titer von in den Kulturüberstand freigesetztem Virus war in den K41-behandelten Ansätzen bis 60 Stunden nach Infektion um ca. das 30-fache reduziert (Abb. 4.9 B). 72 Stunden nach Infektion fiel

der Titer der unbehandelten Zellen aufgrund der sehr weit fortgeschrittenen Synzytienbildung bereits wieder ab. In den K41-behandelten Kulturen stieg der Titer dagegen noch kontinuierlich, da hier die Bildung von Synzytien deutlich gehemmt war. Zudem fielen die Virustiter weitestgehend in den Kulturen am geringsten aus, die erst 1 Stunde nach Infektion mit mAK K41 inkubiert wurden. Diese Ergebnisse zeigte zum einen, dass bereits eine kurze, vorübergehende Behandlung (1 Std.) von Zellen mit mAK K41 ausreichend ist, um dessen hemmenden Effekt zu bewirken. Zum anderen haben die anti-CD9-Antikörper Einfluß auf Replikationsschritte die nach der Virusbindung folgen.

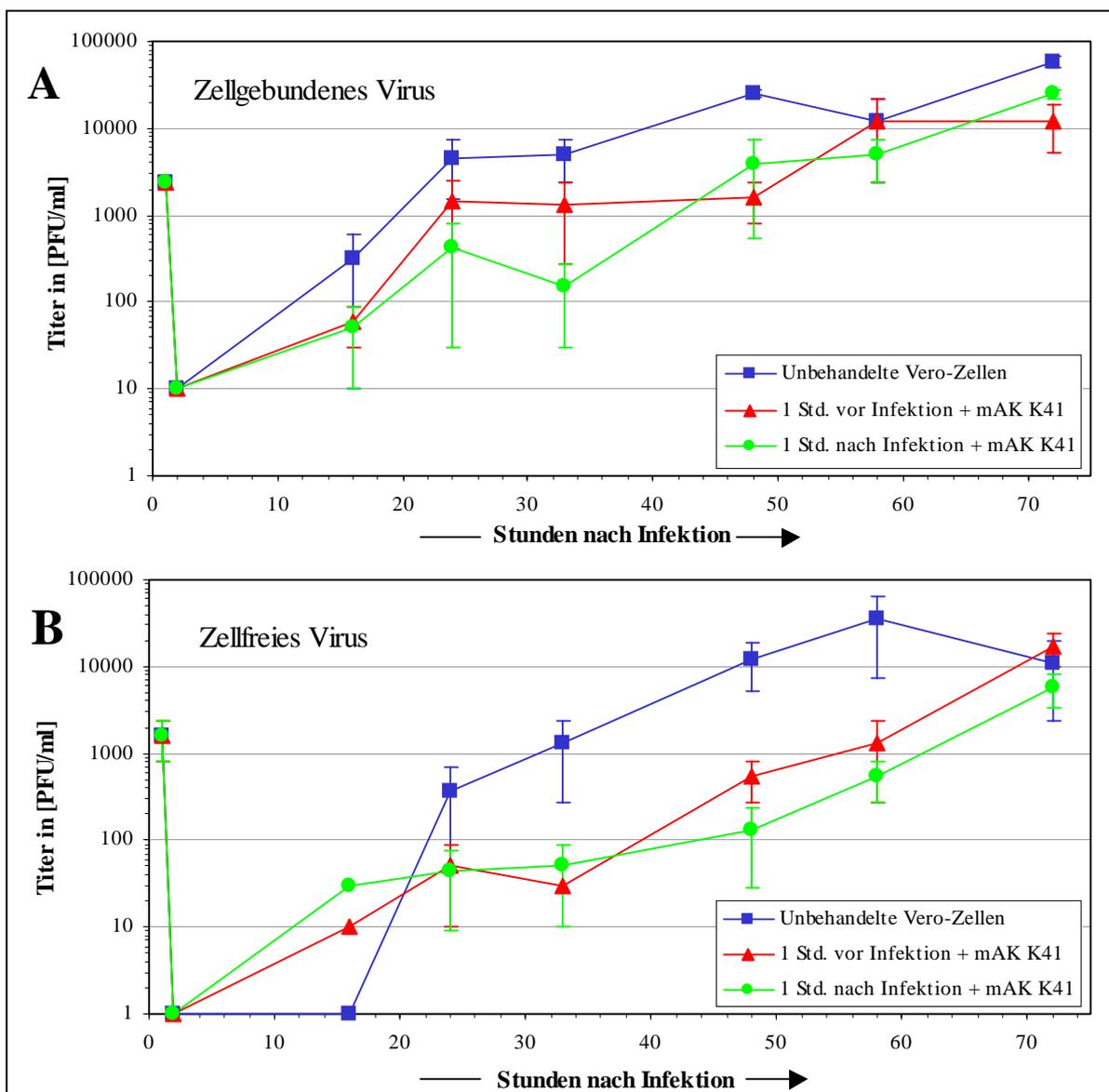


Abb. 4.9: Titration von zellgebundenem und freigesetztem Virus aus CDV-infizierten Zellen. Vero-Zellen wurden entweder unbehandelt gelassen oder sie wurden 1 Std. vor oder 1 Std. nach der Infektion mit OND-LP mit mAK K41 (100 µg/ml) behandelt. Nach der Behandlung mit K41 wurden die Zellen mit Medium gewaschen um ungebundene Antikörper zu entfernen. Zu den angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion wurde das zellgebundene Virus (A) nach einem Zyklus Frieren/Tauen und das zellfreie Virus (B) auf Vero-Zellen titriert (n=4).

4.3.3 Hemmung der Virusfreisetzung im Rahmen einer einstufigen Wachstumskinetik

Da in den vorangegangenen Untersuchungen die Zellen nur mit einer geringen MOI an CDV infiziert wurden, spielt die Ausbreitung der Infektion in den Kulturen eine große Rolle. Eine Hemmung der Infektionsausbreitung durch K41 führt so auch zur Hemmung der Virusproduktion. Um Aussagen über die Wirkung von CD9-Antikörpern auf die Virusfreisetzung machen zu können wurde die Titer an zellgebundenem und zellfreiem Virus bestimmt, welcher im Rahmen einer einstufigen Wachstumskinetik produziert wurde. Hierbei wurden die Zellen mit der hohen MOI von 3 infiziert, wodurch bereits zu Beginn des Experiments nahezu alle Zellen infiziert waren. Dadurch spielte die Ausbreitung der Infektion auf noch uninfizierte Zellen kaum eine Rolle und hatte somit keine Auswirkung auf die Höhe des Virustiters.

Wie man an Abbildung 4.10 erkennt, war unter den Bedingungen einer einstufigen Wachstumskinetik der Titer von zell-assoziiertem Virus in der Gegenwart von mAK K41 nicht signifikant reduziert. Dagegen war der Titer des zellfreien Virus bei Behandlung mit CD9-Antikörpern um den Faktor 5-10 reduziert. Auch in diesem Experiment zeigte sich wieder ein starker Effekt von mAK K41 auf die CDV-vermittelte Bildung von Synzytien (Abb. 4.10 B): In Gegenwart des Antikörpers begann die Plaquebildung um mehr als 24 Stunden später und die Fläche, welche von Synzytien eingenommen wurde, war 30 – 48 Stunden nach Infektion um 60-80% geringer als in den unbehandelten Kulturen. Die Ergebnisse dieses Versuchs deuten darauf hin, dass der anti-CD9-Antikörper bei einer CDV-Infektion gleichzeitig eine Verminderung der Virusfreisetzung und der Plaquefläche auslöst. Allerdings ist anzumerken, dass obgleich die Virusfreisetzung in Anwesenheit von K41 etwas reduziert war, keine Akkumulierung von zell-assoziiertem Virus festzustellen war. Deshalb stellte sich die Frage, ob eventuell die virale Proteinsynthese von CD9-Antikörpern beeinflusst wird.

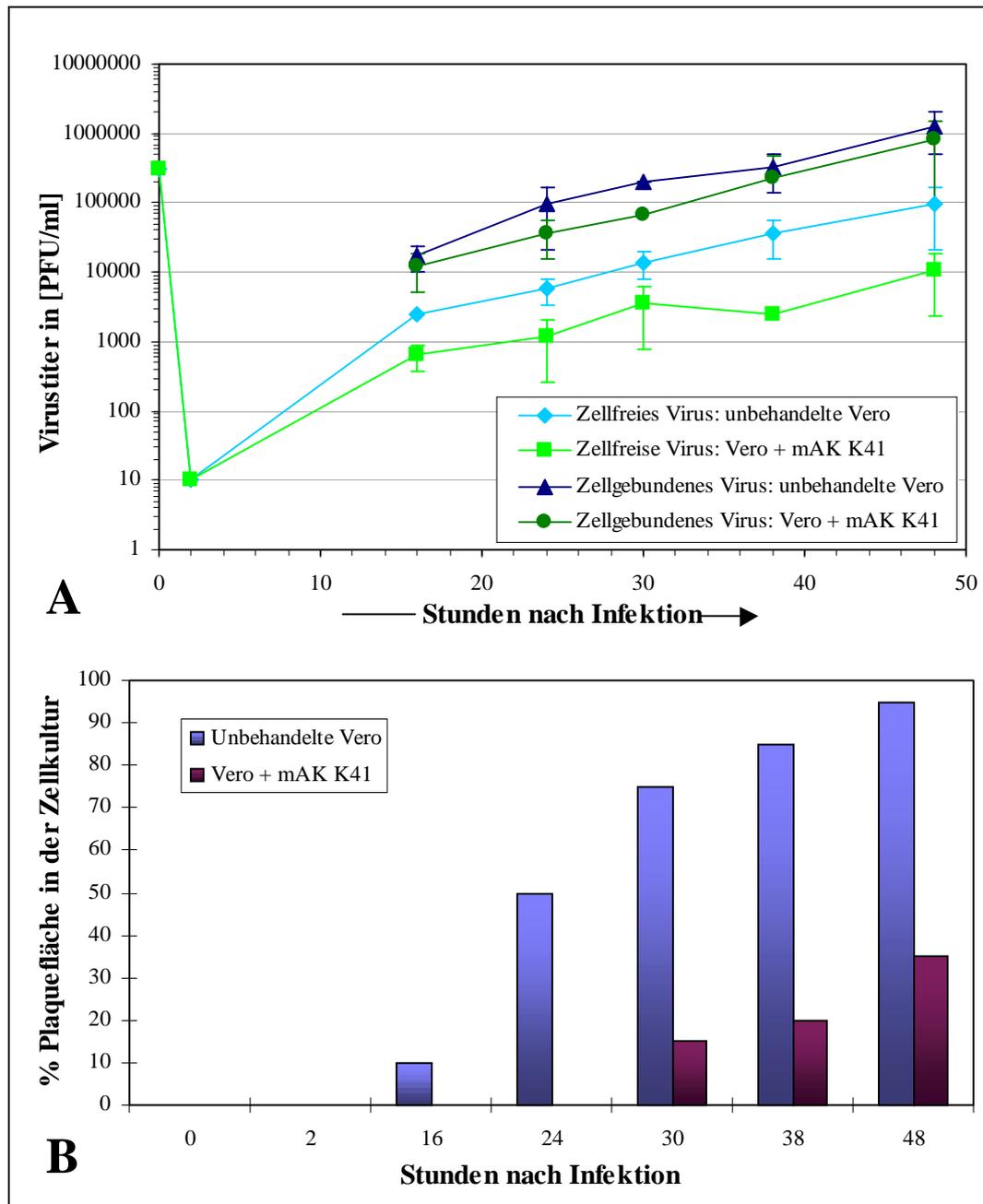


Abb. 4.10: Virustiter im Rahmen einer einstufigen Wachstumskinetik. Vero-Zellen wurden mit CDV OND-LP MOI = 3 infiziert. Ein Teil der Ansätze wurde mit CD9-Antikörper behandelt indem nach der Infektion mAK K41 zum Kulturmedium gegeben wurde (12 μ g/ml). Zu verschiedenen Zeiten wurde zellfreies und zellgebundenes Virus geerntet und im Dreifachansatz auf Vero-Zellen titriert (A). Im Mikroskop wurde zeitgleich der Anteil der Zellkulturfläche bestimmt, der von Synzytien eingenommen wurde, die drei oder mehr Zellkerne enthielten (B).

4.4 Die Produktion viraler mRNA und Proteine wird von anti-CD9-Antikörpern nicht beeinflusst

Nach der Virusaufnahme beginnt die Synthese der viralen mRNA und deren Translation in die viralen Proteine. Deshalb wurde untersucht ob CD9-Antikörper einen direkten Effekt auf diese Prozesse haben.

4.4.1 K41 beeinträchtigt nicht die virale mRNA-Synthese

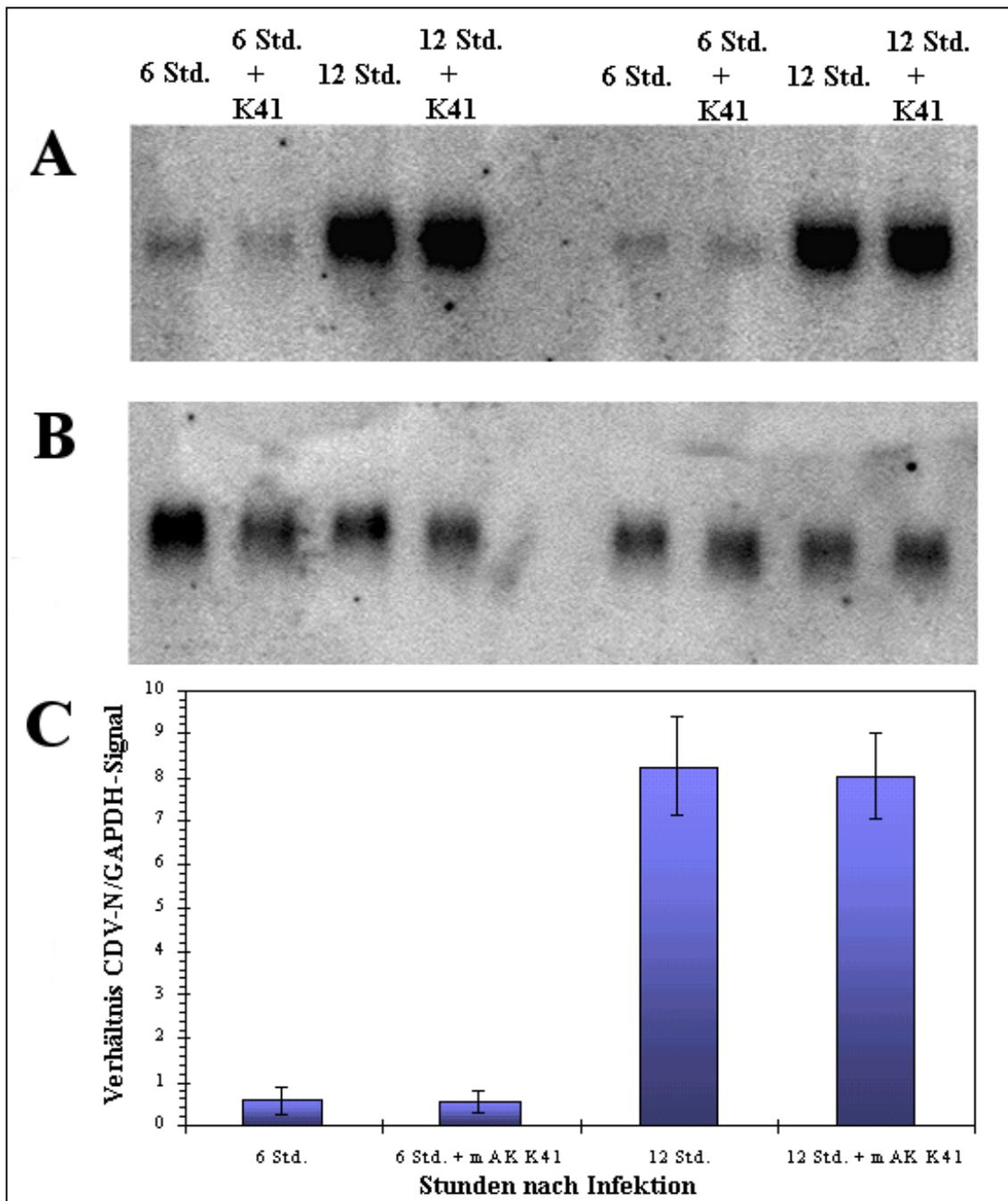


Abb. 4.11: Effekt von mAK K41 auf die Synthese der CDV-N spezifischen mRNA. Vero-Zellen wurden mit CDV OND-LP (MOI = 0,5) infiziert, das Inoculum entfernt und zu einem Teil der Ansätze mAK K41 (12 µg/ml) zugegeben. Die RNA wurde 0, 6 und 12 Std. nach Infektion isoliert und auf Hybond N Filter geblotted. Die Filter wurden mit ³²P-markierten Sonden, die spezifisch für CDV-N (A) und GAPDH (B) waren, hybridisiert. Es sind zwei Experimente dargestellt (Spur 1-4 und Spur 5-8). Die Mittelwerte des Verhältnisses der N/GAPDH-Signale sind in Grafik C abgebildet.

Um zu prüfen, ob ein möglicher direkter Einfluß von mAK K41 auf die primäre virale mRNA-Synthese besteht, wurde virale mRNA 6 und 12 Stunden nach Infektion mit CDV (OND-LP, MOI = 0,5) aus Vero-Zellen isoliert. Die Behandlung mit mAK K41 erfolgte nach Infektion durch Zugabe des Antikörpers ins Kulturmedium (12 µg/ml). Die RNA-Proben

wurden im Northern Blot aufgetragen. Dieser wurde dann mit ^{32}P -markierten, spezifischen Sonden für CDV-N und GAPDH hybridisiert (Abb. 4.11 A, B). GAPDH diente dabei als Kontrolle für die Menge an intakter RNA, da es in der Zelle stets in konstanten Mengen produziert wird. CDV-N wurde gewählt, da das N-Protein (Nukleoprotein) als Hauptbestandteil der Virionen bei einer CDV-Infektion mit der höchsten Kopienzahl an viraler mRNA vorliegt. Ein Effekt von K41 auf die virale m-RNA-Synthese sollte deshalb bei Untersuchung der CDV-N-mRNA am deutlichsten ausfallen. Die sich nach der Hybridisierung ergebenden Signale wurden mit dem Phosphor-Imager quantitativ erfaßt und als das Verhältnis vom CDV-N-Signal zum GAPDH-Signal dargestellt (Abb. 4.11 C).

In den ersten 12 Stunden nach der Infektion findet die primäre Virusreplikation in den initial infizierten Zellen statt und es ist noch keine Synzytienbildung zu beobachten. In den Experimenten wurde während dieser Zeit kein direkter Einfluß von anti-CD9-Antikörpern auf die virale mRNA-Synthese gemessen. Die Menge der synthetisierten CDV-N-mRNA in Gegenwart von mAK K41 unterschied sich nicht signifikant von der in Abwesenheit von K41 gebildeten (Abb. 4.11 C). Dies läßt den Schluss zu, dass die virale RNA-Synthese während des ersten viralen Replikationszyklus durch eine K41-Behandlung nicht gehemmt wird.

4.4.2 Die virale Proteinsynthese wird von CD9-Antikörpern nicht inhibiert

Zur Klärung der Frage, ob mAK K41 möglicherweise eine Wirkung auf die virale Proteinsynthese erzielt, wurde diese unter den Bedingungen einer einstufigen Wachstumskinetik untersucht. Es wurden Vero-Zellen mit OND-LP MOI = 3 infiziert und für 6, 12, 18, 24 und 30 Stunden in Anwesenheit und Abwesenheit von mAK K41 kultiviert. Um die virale Proteinsynthese zu messen, wurden die Zellen die letzten 5 Stunden vor jedem der oben angegebenen Zeitpunkte mit ^{35}S -Methionin und ^{35}S -Cystein markiert. Danach folgt eine Immunopräzipitation mit einem polyklonalen Hunde-Hyperimmun-Serum gegen CDV. Die gefällten Proteine wurden mittels SDS-Gelelektrophorese aufgetrennt und die Banden im Phosphor-Imager detektiert.

Wie Abbildung 4.12 zeigt, wurden die viralen Proteine zu allen Zeitpunkten synthetisiert, ohne dass ein signifikanter Effekt des anti-CD9-Antikörpers zu erkennen war. Zwar ist im abgebildeten Versuch die H-Bande 24 Std. nach Infektion in Anwesenheit von K41 schwächer, aber dieser Effekt trat bei weiteren Experimenten nicht auf. Auch bei Untersuchungen im Durchflußzytometer war unter gleichen Bedingungen 24 Std. nach Infektion keine Unterschiede in der Expression viraler Oberflächenproteine in Anwesenheit und Abwesenheit von K41 messbar. Die schwächere H-Bande ist deshalb wahrscheinlich eher ein experimentelles Artefakt als ein tatsächlicher Effekt des mAK K41, zumal 6 Std. später kein Unterschied mehr zu sehen ist. Da weder eine Akkumulierung noch eine Verringerung der

viralen Proteine in Anwesenheit von mAK K41 feststellbar war, kann davon ausgegangen werden, dass der Hemmeffekt von CD9-Antikörpern auf eine CDV-Infektion nicht auf eine Beeinträchtigung der Virusreplikation zurückzuführen ist.

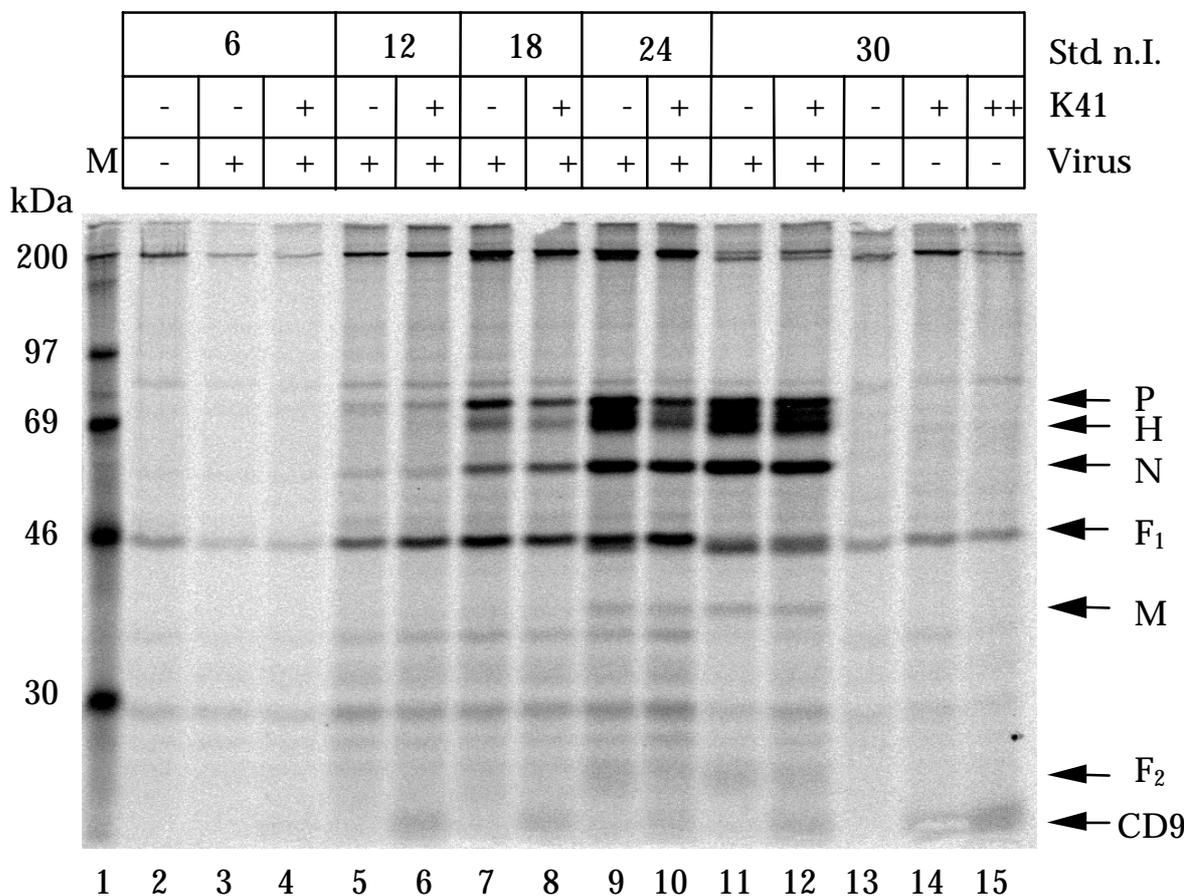


Abb. 4.12: Messung des Einflusses von mAK K41 auf die virale Proteinsynthese. Vero-Zellen wurden mit OND-LP infiziert (MOI = 3) und für 6, 12, 18, 24 und 30 Std. in Anwesenheit und Abwesenheit von K41 (12 µg/ml) kultiviert. Die Zellen wurden 5 Std. mit ³⁵S-Methionin und ³⁵S-Cystein markiert, dann mit einem polyklonalen anti-CDV Antiserum (Spur 1-14) oder mAK K41 (Spur 15) und Protein-A Sepharose-Kügelchen immunopräzipitiert. In den Spuren 4, 6, 8, 10, 12 wurde mAK K41 nach der Infektion (1 Std.) zugegeben und genauso während der Inkubation mit ³⁵S-Methionin und -Cystein. Die Identifikation der viralen Proteine P, H, N, F₁ (niedrigere Bande unterhalb von Aktin), M und F₂ erfolgte nach Vorgabe von Rima et al., 1987. Die F₁-Bande wird teilweise von einer Hintergrundbande überlagert, die in allen Proben zu finden ist. Der in den Kulturen vorhandene mAK K41 führt zu einer sichtbaren CD9-Bande (Spur 4, 6, 8, 10, 12 und 14), ähnlich der Bande die auftrat, wenn mAK K41 für die Präzipitation verwendet wurde (Spur 15).

Eine Möglichkeit für mAK K41 eine hemmenden Effekt zu bewirken wäre noch die Regulierung der Aktivität der viralen Hüllproteine. Gerade die Regulation der Fusionsaktivität der viralen Glykoproteine beruht auf der Spaltung des F-Proteins. Erst dadurch wird das F-Protein in die funktionelle Form überführt und aktiviert. Wie aus der Abbildung 4.12 zu entnehmen ist, erfolgte die Spaltung von F₀ in F₁ und F₂ aber auch in Gegenwart von K41. Es war zudem kein Unterschied in der F₂-Menge in Ab- und Anwesenheit von mAK K41 zu beobachten. Ein Effekt des K41 auf die Aktivierung des F-Proteins ist deshalb unwahrscheinlich.

4.5 CD9-Antikörper hemmen die CDV-vermittelte Zell-Zell-Fusion

Wie bereits erwähnt, fiel in den Experimenten auf, dass die Bildung und Größe der Synzytien in CDV-infizierten Zellkulturen durch eine Behandlung mit mAK K41 stark gehemmt war. Die Zell-Zell-Fusion spielt in mit CDV OND-LP infizierten Zellkulturen eine tragende Rolle bei der Ausbreitung des Virus bzw. der Infektion. Ein Hemmeffekt von mAK K41 auf die Zell-Zell-Fusion würde die Infektionsausbreitung behindern und so, wie unter 4.3.2 beschrieben, indirekt zu einer Verringerung der produzierten Virustiter führen. Zudem würde dadurch erklärt, weshalb die Inhibition der Infektion stärker ausfällt, wenn die Antikörper-Zugabe oder -Inkubation erst nach erfolgter Infektion der Zellen stattfindet. Die Hypothese, dass durch anti-CD9-Antikörper die Virus-vermittelte Zell-Zell-Fusion inhibiert wird, wurde durch die im folgenden beschriebenen Experimente überprüft.

4.5.1 CD9-Antikörper beeinflussen die Fusion von uninfizierten und infizierten HeLa-Zellen

Persistent mit CDV OND-LP infizierte HeLa-Zellen exprimieren an ihrer Oberfläche die viralen Glykoproteine. Allerdings wachsen sie in der Kultur ohne die für die CDV-Infektion charakteristische Synzytienbildung, obwohl im Kulturüberstand infektiöses, Plaque-induzierendes Virus nachweisbar ist. Anscheinend ist mit der Etablierung der Persistenz ein Verlust oder eine Herabregulierung der zellulären Rezeptoren für die viralen Glykoproteine verbunden, wodurch die Zell-Zell-Fusion unterbunden wird.

Werden persistent infizierte HeLa-Zellen zu einer Kultur uninfizierter Zellen gegeben, kommt es zur Fusion der infizierten mit den uninfizierten Zellen und es bilden sich Synzytien aus. Um den Effekt von K41 auf die viral induzierte Zell-Zell-Fusion zu messen, wurden uninfizierte und persistent CDV-inizierte HeLa-Zellen gemischt und dann in Abwesenheit und Anwesenheit von mAK K41 (25 µg/ml) kultiviert. Als Kontrolle wurde ein neutralisierender anti-CDV-H mAK (10 µg/ml) eingesetzt. Zur besseren Visualisierung und Auswertbarkeit des Fusionsprozesses wurden die Zellen mit fluoreszierenden Farbstoffen gefärbt. In Abbildung 4.13 sind die bei der Zell-Zell-Fusion ablaufenden Prozesse und die daraus resultierende Verteilung der verwendeten Farbstoffe schematisch dargestellt.

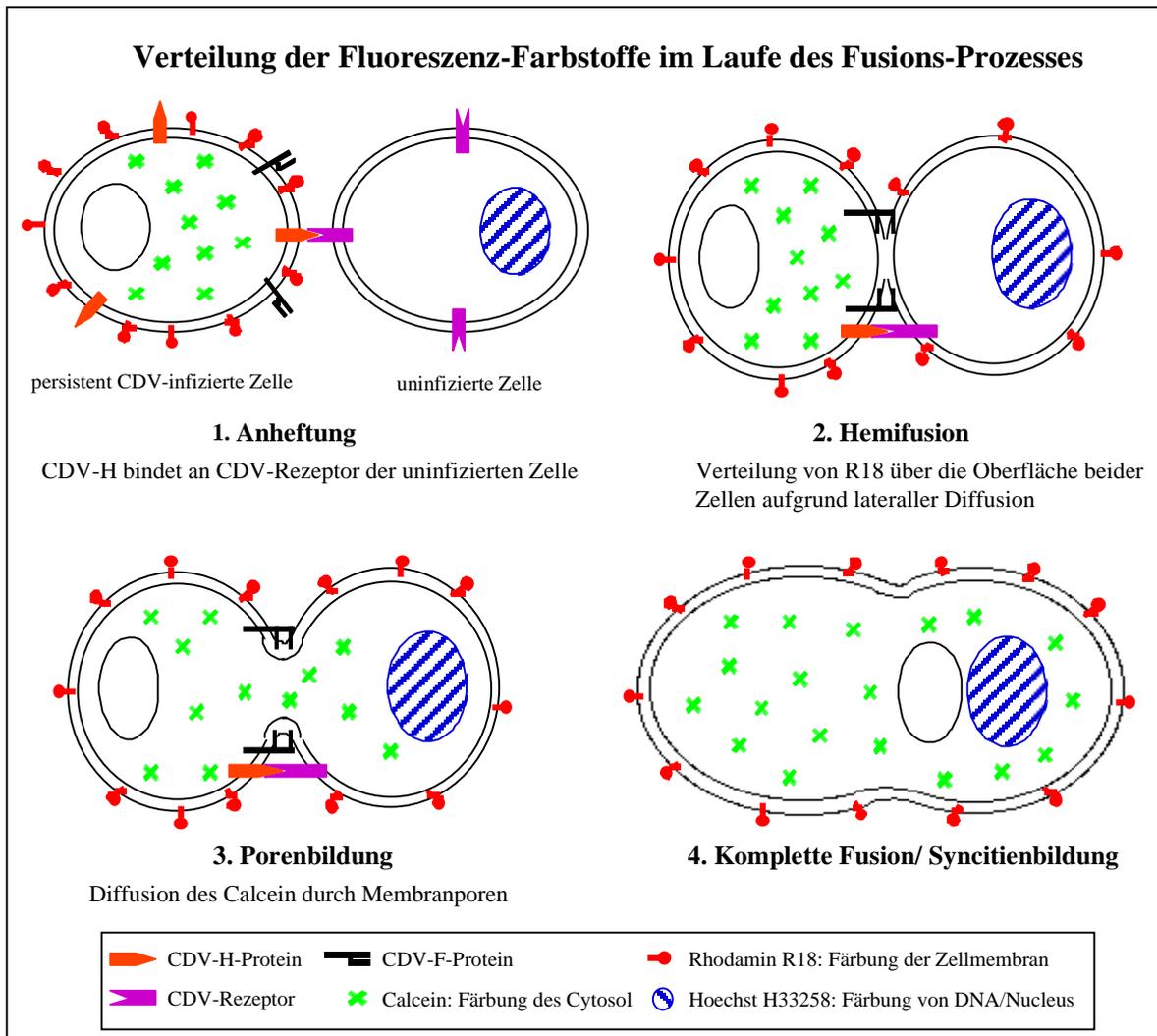


Abb. 4.13: Schematische Übersicht der Fusion von infizierten und uninfizierten HeLa-Zellen. Für die Untersuchung der Fusionsvorgänge wurden drei verschiedene Fluoreszenz-Farbstoffe verwendet: Hoechst H33258 der DNA bzw. den Zellkern blau färbt, Rhodamin R18 ein roter Farbstoff zur Markierung der Zellmembran und Calcein, ein grüner Farbstoff der spezifisch das Cytosol färbt. Die unterschiedlichen Farbstoffe können mit Hilfe verschiedener Filter getrennt oder teilweise kombiniert im Fluoreszenzmikroskop betrachtet werden. Der erste Schritt der Zell-Zell-Fusion ist die Anheftung der infizierten Zelle an die uninfizierte Zelle mittels CDV-H und dessen spezifischem Rezeptor. Darauf initiiert das F-Protein als nächste Stufe die Hemifusion, d.h. die beiden äußeren Schichten der doppelten Zellmembran beider Zellen verschmelzen. Dies erlaubt eine laterale Diffusion und somit eine Verteilung des roten R18 über die Oberfläche beider Zellen. Nach der Hemifusion kommt es durch die Verschmelzung beider Zellmembranen zur Ausbildung von Poren, die das Cytosol der zwei Zellen verbinden und so eine Ausbreitung des Calceins ermöglicht. Dieser Prozess endet mit der vollständigen Fusion der Zellen zu einem Syncytium mit zwei nebeneinander liegenden Zellkernen.

4.5.1.1 Die Hemifusion wird durch CD9-Antikörpern nicht blockiert

In dem hier beschriebenen Fusionsystem beginnt die Hemifusion nicht sofort nach der Zugabe der infizierten Zellen zu den uninfizierten Zellen. Erste Hemifusionen sind erst nach ca. 60 Minuten zu beobachten. Die Hemifusion ist dann 90 bis 120 Minuten nach Zugabe der persistenten HeLa-Zellen am deutlichsten ausgeprägt. Zeitgleich treten auch die ersten kleineren Synzytien auf. Die Zell-Zell-Fusion läuft also im Vergleich zur Virus-Zell-Fusion deutlich langsamer ab. Um die Wirkung von K41 auf die Hemifusion zu testen wurden uninfizierte HeLa-Zellen mit dem Hoechstfarbstoff und persistent infizierte Zellen mit R18 und

Calcein gefärbt. Die vereinigten Zellpopulationen wurden in Abwesenheit von Antikörpern, in Anwesenheit von mAK K41 oder anti-CDV-H mAK zwei Stunden kultiviert und dann auf Hemifusionen untersucht. Hemifusionen konnten, wie in Abbildung 4.14 dargestellt, daran identifiziert werden, dass die Membran der uninfizierten Zellen (blauer Nukleus) bereits rot gefärbt waren, aber noch kein Calcein ins Cytosol übergegangen war.

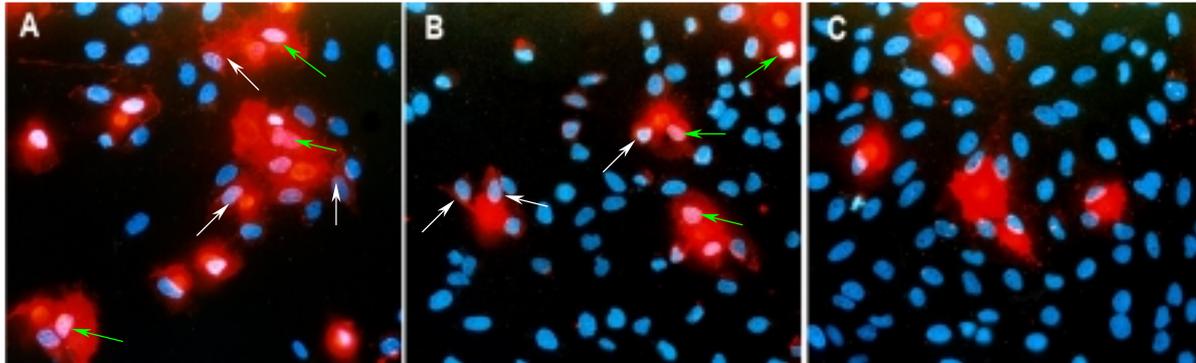


Abb. 4.14: Wirkung von CD9-Antikörpern auf die Hemifusion. Uninfizierte HeLa wurden mit Hoechst H33258 und persistent infizierte HeLa mit R18 und Calcein gefärbt. Nach Zugabe der infizierten Zellen zu den uninfizierten Zellen wurden die verschiedenen Ansätze 2 Stunden in Abwesenheit von Antikörpern (A), in Anwesenheit von mAK K41 (B) oder in Anwesenheit eines α -CDV-H mAK (C) kultiviert. Die abgebildeten fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen entstanden durch eine Doppelbelichtung mit einem Filter für R18 und einem Filter für Hoechst H33258. Kommt es zwischen den uninfizierten und infizierten Zellen zur Porenbildung, geht Calcein in das Cytosol der uninfizierten Zelle über. Dies hat eine stärker Hintergrundhelligkeit zur Folge und die Zellkerne der vormals uninfizierten Zellen erscheinen in der Doppelbelichtung nicht mehr blau sondern weiß bis rosa. Dadurch ist hier eine Unterscheidung von Hemifusion (weise Pfeile) und Fusion (grüne Pfeile) möglich.

Die unbehandelten (Abb. 4.14 A) und mit K41 behandelte Ansätze (Abb. 4.14 B) zeigten sowohl Hemifusion als auch Fusion. In Ansätzen mit α -CDV-H mAK (Abb. 4.14 C) sind dagegen keine Anzeichen für eine Hemifusion oder Fusion zu sehen. In den Versuchen war zudem zu beobachten, dass der Anteil an deutlichen Hemifusionen relativ gering war. Dies ist damit zu begründen, dass die Hemifusion schnell in eine komplette Zell-Zell-Fusion übergeht. Eine Arretierung und damit ein Akkumulieren von Zellen in der Hemifusion konnte weder in Abwesenheit noch in Anwesenheit der verwendeten Antikörper beobachtet werden. Zwischen den unbehandelten und mit mAK K41 behandelten Ansätzen war kein signifikanter Unterschied bezüglich der Anzahl der Hemifusionen zu erkennen. Leider konnte mit dem verwendeten Versuchssystem nicht geklärt werden, ob es eventuell Unterschiede in der Geschwindigkeit, mit der die Hemifusion abläuft, gab. Es ließ sich also feststellen, dass CD9-Antikörper die Initiierung von Hemifusionen nicht blockierte. Dagegen war in Gegenwart des anti-CDV-H Antikörpers kein Anzeichen von Hemifusion auszumachen. Der Antikörper verhindert die Bindung des H-Proteins an den zellulären Rezeptor. Dieser Schritt scheint damit auch für CDV eine zwingend notwendige Voraussetzung für die viral induzierte Zell-Zell-Fusion zu sein, da ohne ihn selbst eine Hemifusion nicht möglich ist.

4.5.1.2 Die Zell-Zell-Fusion wird durch CD9-Antikörper stark gehemmt

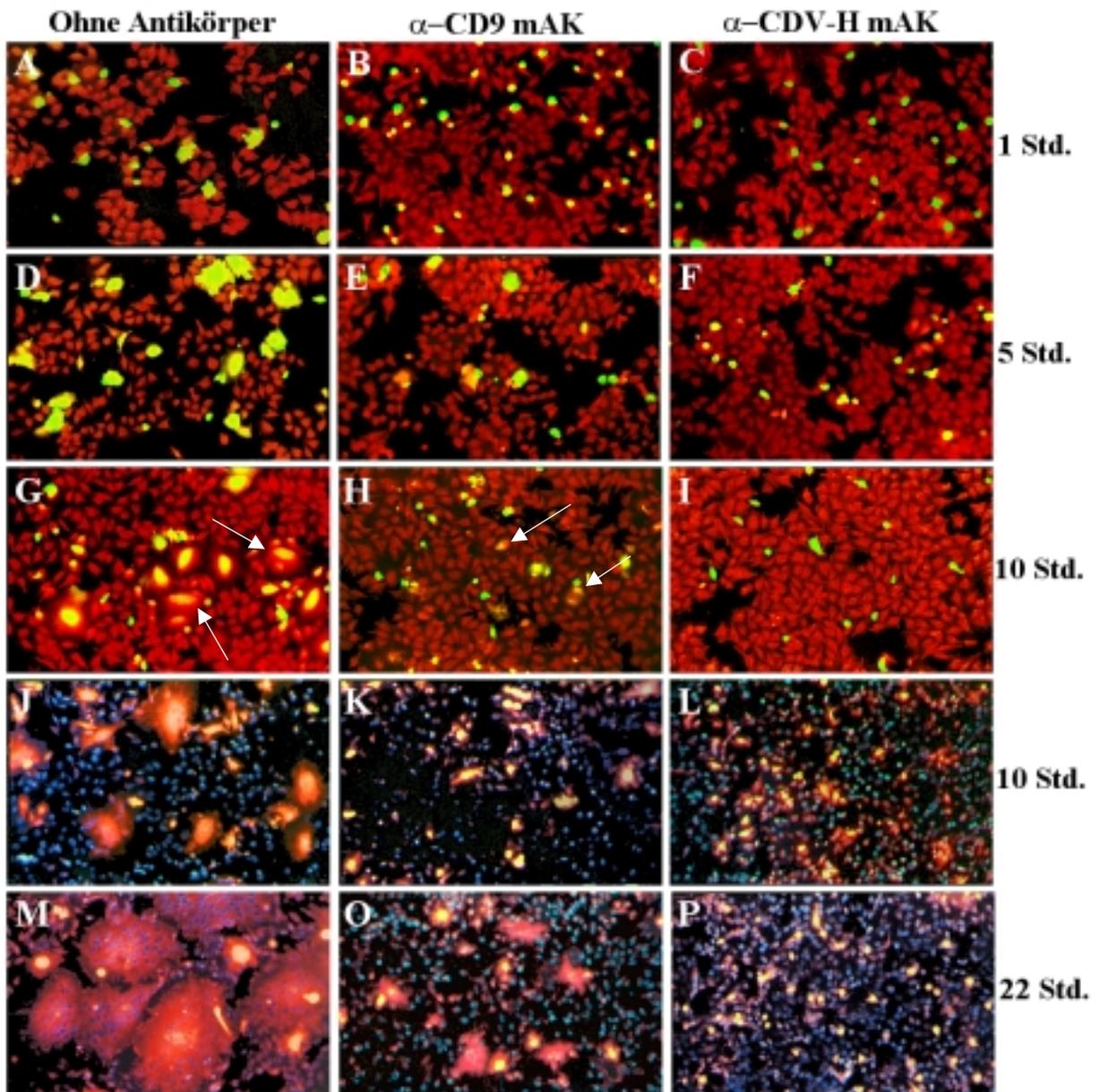


Abb. 4.15: Bestimmung des Effekts von mAK K41 auf das Ausmaß der Zell-Zell-Fusion. Mischungen aus uninfizierten und persistent infizierten HeLa-Zellen wurden in Abwesenheit von Antikörpern (A, D, G, J, M), in Anwesenheit von mAK K41 (B, E, H, K, N), oder in Anwesenheit eines anti-CDV-H mAK (C,F,I,L,P) kultiviert. Das Ausmaß der Membrandurchmischung (Hemifusion) und der vollständigen Fusion wurde mit dem Fluoreszenzmikroskop über einen Zeitraum von 22 Stunden untersucht.

(A-I): Zur Untersuchung früher Zeitpunkte nach Mischung der Zellpopulationen wurden uninfizierte Zellen mit Rhodamin R18 (rot) und infizierte Zellen mit Calcein (grün) markiert. Bei Zell-Zell-Fusion wechselt die Farbe der wachsenden Synzytien von grün (1 Std. nach Mischung) ins Orange (10 Std., Pfeile).

(J-O): Um die großen Synzytien zu späteren Zeitpunkten sichtbar zu machen wurden uninfizierte HeLa mit Hoechst H33258 (blau) und infizierte Zellen mit Rhodamin R18 + Calcein (gelb) markiert. Dadurch färben sich die großen Synzytien, die sich in Abwesenheit von Antikörpern bildeten, rot, während einzelne persistent infizierte Zellen gelb erscheinen.

Zur Untersuchung der Fusion im Zeitraum bis zu 12 Stunden nach Mischung der beiden Zellpopulationen wurden die uninfizierten Zellen mit Rhodamin R18 (rot) und die infizierten HeLa-Zellen mit Calcein (grün) gefärbt. Das Ausmaß der Membrandurchmischung (Hemifusion) und der vollständigen Fusion wurde im Fluoreszenzmikroskop zu verschiedenen Zeitpunkten beobachtet (Abb. 4.15 Reihe 1-3).

Wiederum war im Hinblick auf die Ausbreitung und das Ausmaß der Hemifusion kein signifikanter Unterschied zwischen K41-behandelten und unbehandelten Kulturen erkennbar. Bei Zugabe des anti-CDV-H mAK war dagegen keine Hemifusion zu sehen. Kommt es im Versuchsansatz zur Zell-Zell-Fusion, weisen die gebildeten Synzytien eine orange Farbe auf (Abb. 4.15 G, Pfeile). In den Ansätzen ohne Antikörper sind schon nach 5 Stunden größere Synzytien vorhanden, während in Anwesenheit von mAK K41 selbst 10 Stunden später nur wenige, kleine Plaques zu finden sind (Abb. 4.15 H, Pfeile). Wurden die Zellen mit dem Antikörper gegen CDV-H behandelt, war die Zell-Zell-Fusion bis zu 10 Stunden und darüber hinaus komplett gehemmt.

Um die Bildung und Ausbreitung von Synzytien im Zeitraum von 10 – 22 Stunden nach Mischung der Zellen besser beobachten zu können wurden die Zellkerne der uninfizierten Zellen mit Hoechst H33258 (blau), und infizierte Zellen mit Rhodamin R18 plus Calcein (gelb) gefärbt (Abb. 4.15 Reihe 4 + 5). In Abwesenheit von Antikörpern entstehen große, rot gefärbte Synzytien die nach 22 Stunden teilweise mehr als 50 Zellkernen beinhalten. Die Größe der aus uninfizierten und persistent infizierten HeLa-Zellen entstehenden Synzytien wurde dagegen durch CD9-Antikörper drastisch reduziert. Der Effekt von mAK K41 unterschied sich aber deutlich vom Effekt des CDV-H Antikörpers, der die Fusion komplett blockierte. Die Tatsache, dass sich auch in Gegenwart von mAK K41 kleine Synzytien bildeten, deutet darauf hin, dass der hauptsächliche Effekt von anti-CD9-Antikörpern nicht eine komplette Hemmung der Zell-Zell-Fusion ist, sondern eine Reduzierung der Geschwindigkeit der Synzytienbildung. Es bleibt zu klären, ob dies auf einen langsameren Ablauf einzelner Fusionsprozesse oder eine Veränderung der Membraneigenschaften zurückzuführen ist.

4.5.1.3 CD9-Antikörper erzielen ihre Wirkung sowohl auf infizierten als auch auf uninfizierten HeLa-Zellen

CD9-Antikörper wirken sich hemmend auf die Zell-Zell-Fusion von uninfizierten und CDV-infizierten Zellen aus. Es stellt sich dabei die Frage, ob dieser Hemmeffekt auf die uninfizierten oder auf die infizierten Zellen wirkt. Hat der Antikörper nur Einfluß auf infizierte Zellen oder ist es ausreichend nur die uninfizierten Zellen mit K41 zu behandeln um die Zell-Zell-Fusion zu inhibieren? Um diese Frage zu klären wurden uninfizierte und persistent infizierte HeLa-Zellen entweder unbehandelt gelassen, oder für eine Stunde mit mAK K41 inkubiert und anschließend zur Entfernung nichtgebundener Antikörper zweimal mit Medium gewaschen. Dann wurden die unterschiedlich behandelten Zellen im Verhältnis

1:1 (uninfiziert zu infiziert) wie folgt gemischt: Uninfizierte und infizierte Zellen die nicht mit mAK K41 behandelte waren, zwei Ansätze bei denen entweder die uninfizierten oder die infizierten Zellen mit K41 vorinkubiert waren und ein Ansatz in dem beide Zellpopulationen mit mAK K41 vorinkubiert wurden. Nach 15 Stunden wurden von jedem Ansatz vier zufällig ausgewählte Bereiche der Zellkultur abfotografiert, gescanned und die jeweilige Fläche der Zellkultur, die von Synzytien eingenommen wurde, mit Hilfe eines Bildauswertungsprogrammes (NIH-Image Graphics Software) am Computer vermessen. Bei dieser Auswertung wurden nur Synzytien mit drei und mehr Zellkernen zur Vermessung herangezogen. In Abbildung 4.16 ist ein repräsentatives Foto zu jedem Ansatz abgebildet.

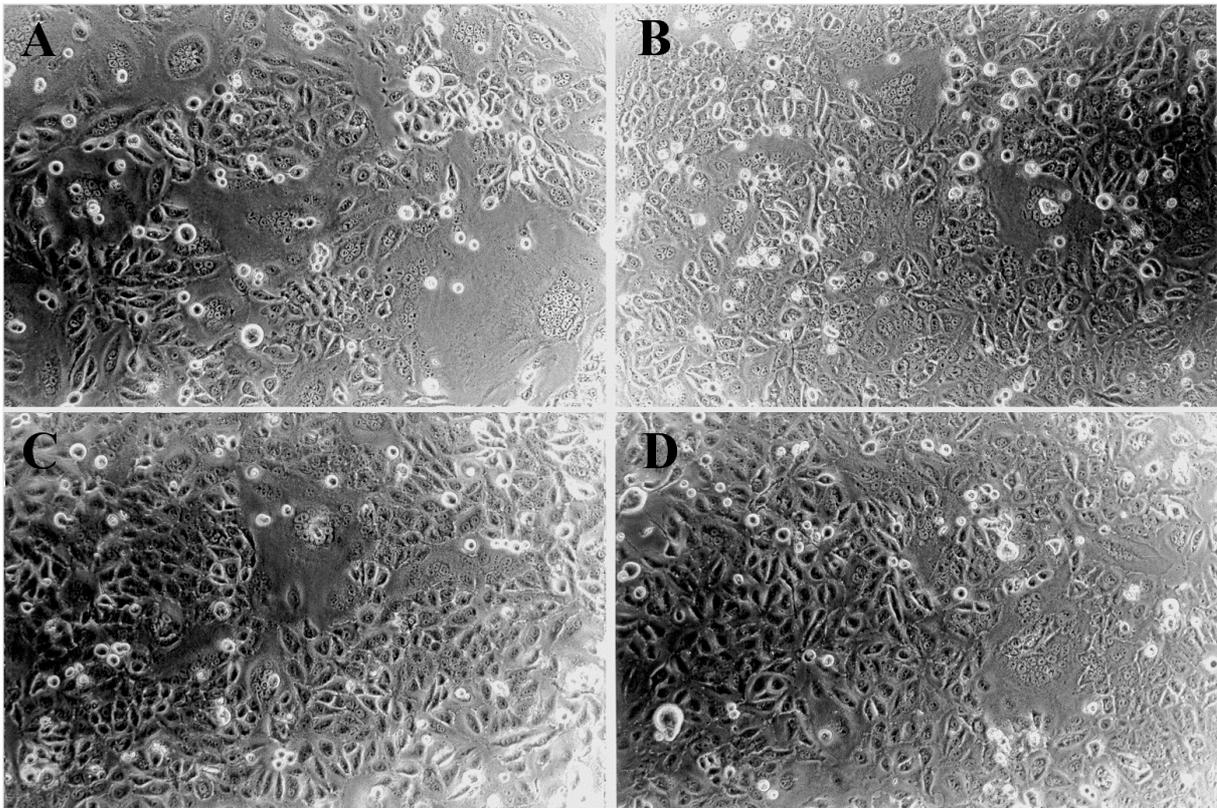


Abb. 4.16: Aufnahmen der Synzytienbildung 15 Stunden nach Mischung unterschiedlich vorbehandelter uninfizierter und persistent infizierter HeLa-Zellen. A) Uninfizierte und persistent infizierte HeLa-Zellen im Verhältnis 1:1 gemischt. B) Persistent infizierten Zellen vor Mischung mit mAK K41 vorinkubiert + uninfizierte HeLa-Zellen. C) Uninfizierte Zellen mit K41 vorbehandelt + infizierte HeLa-Zellen. D) Sowohl infizierte als auch uninfizierte Zellen vor Mischung mit K41 inkubiert. 15 Stunden nach Mischung der Zellpopulationen wurde ein zufällig gewählter Bereich der Zellkultur fotografiert (Vergrößerung 1:100) und mit einem Bildverarbeitungsprogramm am Computer ausgewertet.

Nach Auswertung des Versuchs ergaben sich die in Abbildung 4.17 grafisch dargestellten Ergebnisse.

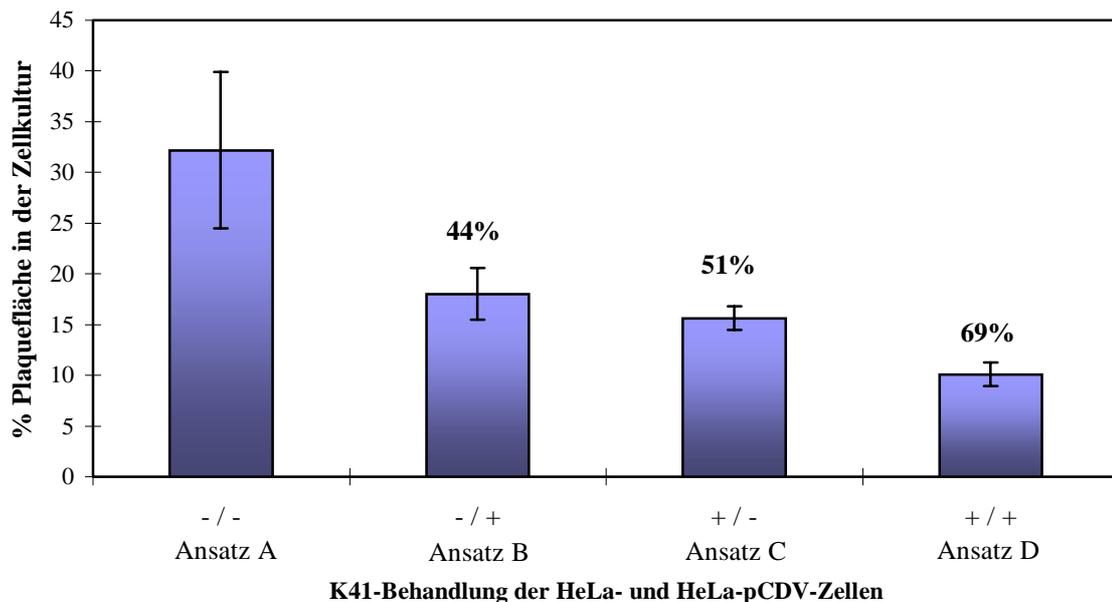


Abb. 4.17: CD9-Antikörper erzielen ihren fusionsinhibierenden Effekt auf infizierten und uninfizierten Zellen. 15 Stunde nach einer 1:1 Mischung von uninfizierten und persistent infizierten HeLa-Zellen waren 33% der Zellkulturfläche von Synzytien bedeckt (A). In den Ansätzen B und C, in denen die infizierten, bzw. uninfizierten Zellen mit K41 vorinkubiert wurden, umfaßte die Synzytienfläche 18% bzw. 15%. Waren sowohl die uninfizierten, als auch die infizierten Zellen mit mAK K41 vorinkubiert betrug die Synzytienfläche nur noch 10%. Die über den Balken angegebenen Prozentzahlen geben die Reduzierung der Synzytienfläche gegenüber der Synzytienfläche von Ansatz A wieder.

Wie aus der Abbildung 4.17 entnommen werden kann, ist es ausreichend nur eine der beiden Zellpopulationen mit mAK K41 zu behandeln, um eine 44% (Ansatz B) bzw. 51% (Ansatz C) Hemmung der Zell-Zell-Fusion zu erreichen. Diese Hemmung beruht dabei nicht auf einer Reduzierung der Anzahl der Plaques in den Zellkulturen: In den Ansätzen B und C war durchschnittlich dieselbe Anzahl an Synzytien zu finden wie in Ansatz A. Dagegen war, wie schon im vorhergehenden Experiment (4.5.1.2), die Größe der Synzytien in B und C deutlich geringer. Diese Ergebnisse zeigen, dass der CD9-Antikörper nicht spezifisch auf infizierte Zellen wirkte, da auch eine Behandlung uninfizierter Zellen mit K41 den gleichen Hemmeffekt hervorrief. Es ist deshalb wahrscheinlich ein zelluläres Oberflächenmolekül, welches durch CD9 reguliert wird und nicht die Aktivität der viralen Hüllproteine. Von diesem Oberflächenmolekül ist anzunehmen, dass es an Zell-Zell-Interaktionsmechanismen beteiligt ist, welche die viral induzierte Zell-Zell-Fusion verstärken oder erleichtern.

Noch stärker war die Reduzierung der Synzytienfläche wenn beide, uninfizierte und infizierte Zellen, mit K41 vorinkubiert waren. In diesem Fall betrug die Reduktion 69%. Verglichen mit den Ansätzen B und C zeigt sich also ein additiver Effekt auf die Fusionshemmung, wenn beide Zellpopulationen mit mAK K41 behandelt waren. Allerdings beträgt die Reduktion nur 69% und nicht, wie sich aus Addition der Reduktion von B und C ergeben würde, ca. 90 – 95%. Man kann daraus ableiten, dass dem Effekt der CD9-Antikörper auf uninfizierte und persistent infizierte Zellen wahrscheinlich nicht zwei unterschiedlichen Mechanismen zu Grunde liegen. Vielmehr scheint es für eine Hemmung der Zell-Zell-Fusion von Vorteil zu

sein, wenn Zell-Zell-Interaktionsmechanismen auf beiden Zellarten durch die Wirkung des CD9-Antikörpers beeinflusst werden. Diese Ergebnisse sind nochmals ein Hinweis darauf, dass CD9-Antikörper die Zell-Zell-Fusion und somit die Synzytienbildung verlangsamen, aber dies auch nur bis zu einem gewissen Grad. Eine vollständige Blockierung der Fusion war selbst durch hohe Konzentrationen an mAK K41 nicht möglich. Es scheint durch die Bindung des anti-CD9-Antikörpers zu einer Veränderung der Zelle zu kommen, die zwar die Zell-Zell-Fusion, aber nicht die Virus-Zell-Fusion beeinträchtigt.

4.5.2 Durch die Hemmung der CDV-induzierten Zell-Zell-Fusion wird indirekt die Virusproduktion im späteren Verlauf der CDV-Infektion inhibiert

Für Paramyxoviren wurden schon Anfang der 80er Jahre Peptide beschrieben, welche die Virus-Zell-Fusion und die viral induzierte Zell-Zell-Fusion inhibieren, ohne allerdings die Virusfreisetzung zu beeinträchtigen (Richardson et al., 1980 und 1983). Eines dieser fusionsinhibierenden Peptide ist FIP mit der Sequenz Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH (Z=Carbobenzoxygruppe am N-terminalen Ende). FIP blockiert bei Infektion von Zellen mit Masern (Stamm Edmonston) ab einer Konzentration von 25 μM die Synzytienbildung vollständig (Weidmann et al. 2000). Es sollte getestet werden ob FIP auch bei einer CDV-Infektion die Zell-Zell-Fusion hemmen kann. Ein Vergleich des Effekts von FIP und K41 könnte die Hypothese, dass CD9-Antikörper die Zell-Zell-Fusion inhibieren, nochmals bestätigen.

4.5.2.1 Das fusionshemmende Peptid FIP (Z-fFG) hemmt auch die CDV-vermittelte Zell-Zell-Fusion

Um zu testen, ob FIP die Synzytienbildung bei CDV-infizierten Zellen hemmen kann, wurden Vero-Zellen mit CDV-OND-LP (MOI=0,1) für eine Stunde bei 37 °C infiziert und dann ohne oder mit FIP in Konzentrationen von 25 –100 μM kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Synzytien-Flächen im Mikroskop bestimmt und miteinander verglichen. Dabei zeigte sich, dass FIP in diesen Konzentrationen nur eine geringe Verminderung der Plaquefläche bewirkte. Der Grund für die schwächere Wirkung von FIP bei CDV im Vergleich zu MV dürften Sequenzunterschiede im F-Glykoprotein sein. Erst als FIP in einer Konzentration von mindestens 400 μM eingesetzt wurde, konnte eine deutliche Reduzierung der Synzytienbildung erreicht werden. Wie aus Abbildung 4.18 ersichtlich, reduzierte das Peptid die Plaquefläche allerdings nur um ca. 40%, während mAK K41 zeitgleich eine Reduzierung um etwa 80% bewirkte.

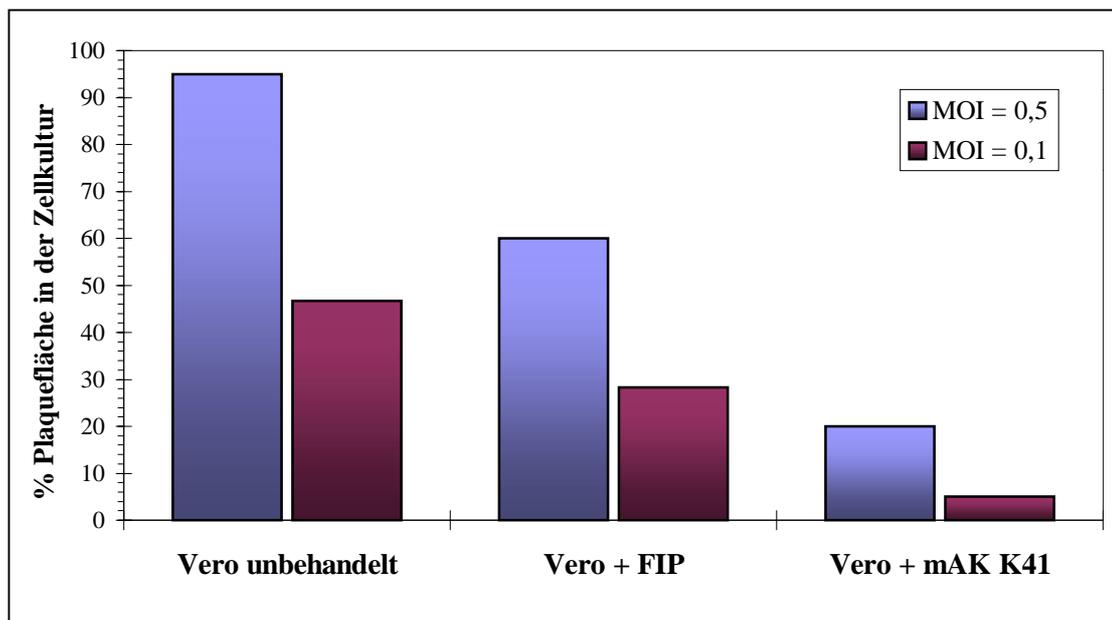


Abb. 4.18: Wirkung des fusionsinhibierenden Peptids FIP auf die CDV-vermittelte Zell-Zell-Fusion. Vero-Zellen wurden mit CDV OND-LP (MOI = 0,5 oder 0,1) für 1 Std. bei 37°C infiziert. Danach wurde FIP (200 µg/ml) oder mAK K41 (12 µg/ml) ins Kulturmedium gegeben. 24 Std. nach Infektion wurde dann mit dem Lichtmikroskop die Synzytienfläche in der Zellkultur bestimmt.

4.5.2.2 Die Hemmung der CDV-induzierten Zell-Zell-Fusion reduziert indirekt die Menge an viraler m-RNA zu späteren Zeitpunkten nach der Infektion

Wenn die Zell-Zell-Fusion durch CD9-Antikörper gehemmt wird, sollten ähnliche Effekte zu beobachten sein wie bei der Hemmung der Fusion durch andere Mittel. Ein solches Mittel ist das fusionsinhibierende Peptid FIP (Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH), welches bei Masern- und CDV-Infektionen die Zell-Zell-Fusion hemmt.

Im Falle der CDV-Infektion bewirkt eine Zugabe von 400 µM FIP im Zeitraum bis 24 Std. nach Infektion eine Hemmung der Synzytienbildung von 40 – 50%. Um zu analysieren, wie sich die Hemmung der Zell-Zell-Fusion auf die Menge an viraler m-RNA in der Zellkultur auswirkt, wurden Vero-Zellen mit einer geringen MOI an CDV (OND-LP; MOI = 0,1) infiziert. Die Mengen an viraler m-RNA wurden dann zu bestimmten Zeitpunkten nach Einsetzen der Bildung von Synzytien verglichen. Im Gegensatz zu den Bedingungen der Experimente unter 4.3.3 und 4.4.2 ist hier die Virusvermehrung in der Kultur abhängig von der Weitergabe der Infektion von Zelle zu Zelle. Die Zugabe von mAK K41 allein, FIP allein oder einer Kombination von K41 und FIP zur Zellkultur erfolgte 12 Stunden nach der Infektion, um bis zu diesem Zeitpunkt eine gleiche Vermehrung des Virus in den Kulturen zu gewährleisten. Die gesamte RNA der einzelnen Kulturen wurde 6, 12, 18 und 24 Stunden nach Infektion isoliert. Die Proben wurden auf Hybond N Filter geblotted und mit ³²P-markierten Sonden für CDV-N und GAPDH hybridisiert. Die CDV-N und GAPDH Signale wurden dann mit einem Phosphor-Imager quantifiziert (Abb. 4.19).

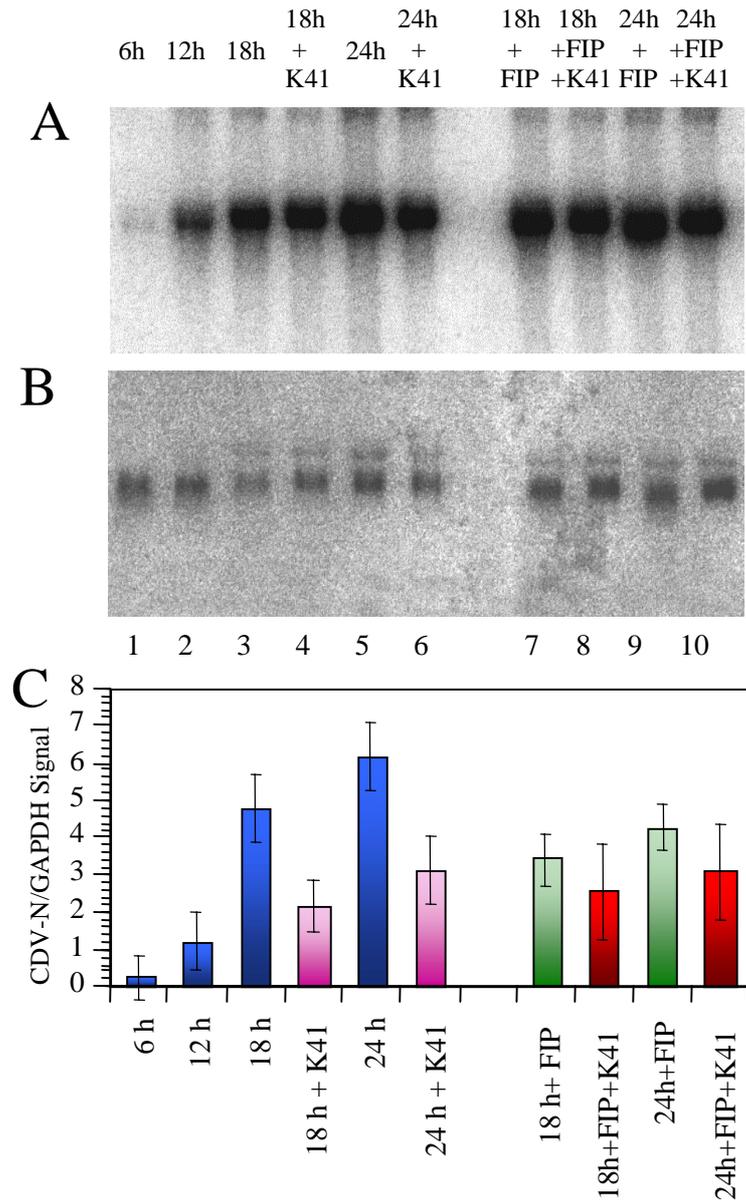


Abb. 4.19: Der Effekt von mAK K41 und FIP auf den Gehalt an CDV-N-mRNA unter Bedingungen, die eine Virusausbreitung durch Zell-Zell-Fusion erlauben. Vero-Zellen wurden mit CDV (OND-LP) unter Verwendung einer niedrigen MOI von 0,1 infiziert. FIP (300µg/ml) allein, mAK K41 (12 µg/ml) allein oder eine Kombination von beiden Substanzen wurden dann 12 Stunden nach Infektion den Kulturen zugegeben. 6, 12, 18 und 24 Stunden nach Infektion wurde die RNA der Proben isoliert, auf Hybond N Filter geblotted und mit ³²P-markierten Sonden für CDV-N(A) und GAPDH (B) hybridisiert. Mittelwerte des Verhältnisses der N/GAPDH-Signale sind in Grafik C wiedergegeben.

Unter diesen Bedingungen war die Menge an viraler m-RNA in Gegenwart von mAK K41 18, bzw. 24 Stunden nach Infektion durchschnittlich um 50 und 53% reduziert. Die Zugabe von 300 µg FIP verursachte zeitgleich eine Reduktion von im Mittel etwa 30%. In Gegenwart der Kombination von FIP und K41 war die Menge an CDV-N-mRNA um ca. 50% verringert. Es war also kein deutlicher additiver Effekt von FIP und K41 feststellbar. Man kann deshalb davon ausgehen, dass die beobachtete Reduktion der viralen mRNA-Mengen durch FIP oder K41 auf dem gleichen Mechanismus beruht. Da FIP bekannterweise die Fusion von Zellen hemmt, kann daraus geschlossen werden, dass K41 ebenfalls die Zell-Zell-Fusion inhibiert.

Die beobachtete Reduktion viraler RNA zu späteren Zeitpunkten nach Infektion ist somit ein indirekter Effekt einer Hemmung der Zell-Zell-Fusion und der Virusausbreitung in der Zellkultur durch Synzytienbildung.

4.5.3 CD9-Antikörper hemmen die CDV-Infektion nicht in furin-defizienten Zellen

LoVo-Zellen (Humane Colon Adenokarzinom-Zellen) zeichnen sich dadurch aus, dass sie kein funktionales Furin, eine Subtilisin-ähnliche Protease, bilden können. Furin ist essentiell bei der proteolytischen Spaltung des CDV F₀-Proteins, ohne die es zu keiner fusogenen Aktivität des F-Proteins kommt. LoVo-Zellen exprimieren CD9, sind mit CDV infizierbar, zeigen aber während der Infektion wegen der fehlenden Aktivierung des F-Proteins keinen zytopathischen Effekt in Form von Synzytien. Trotz der Furin-Defizienz ist im Kulturüberstand aber infektiöses Virus nachweisbar, da andere Proteasen einen geringen Teil des F₀-Proteins spalten. Die Menge an fusogenem F-Protein ist aber anscheinend nicht ausreichend um eine Zell-Zell-Fusion zu initiieren. Deshalb wurden LoVo-Zellen herangezogen um zu testen, ob mAK K41 auch eine CDV-Infektion hemmen kann, bei der eine Virusausbreitung durch Zell-Zell-Fusion nicht möglich ist.

LoVo-Zellen wurden mit CDV (MOI = 0,2) infiziert. 12 Stunden nach Infektion wurden mAK K41 (12 µg/ml) zugegeben oder die Zellen unbehandelt gelassen. 24 und 72 Stunden nach Infektion wurde der Überstand für eine Titerbestimmung und die Zellen für ein RNA-Isolierung geerntet. Der Titer an freigesetztem Virus wurde durch Endpunkttitration auf Vero-Zellen bestimmt. Die RNA wurde auf Hybond N Filter geblotted und die mRNA von CDV-N und GAPDH mit ³²P-markierten Sonden detektiert. Die Quantifizierung der Signale erfolgte dann mit dem Phosphor-Imager.

Es stellte sich heraus, dass CD9-Antikörper keinen hemmenden Effekt auf den Infektionsverlauf in LoVo-Zellen haben (Abb. 4.20). In Anwesenheit von mAK K41 war weder die Menge an freigesetztem Virus noch die Synthese der viralen N-mRNA reduziert. K41 bewirkt also keine Hemmung, wenn sich die CDV-Infektion nicht durch Zell-Zell-Fusion ausbreitet. Allerdings ist zu beobachten, dass sich die Infektion mit CDV-OND-LP bei LoVo-Zellen nur sehr langsam in der Zellkultur ausbreitete. Nach der Infektion stieg der Gehalt an CDV-N-mRNA im Zeitraum von 24 Stunden deutlich an, blieb dann aber bis 72 Stunden nach Infektion nahezu konstant. Die Titer der in das Kulturmedium abgegebenen Viruspartikel nahm zwar im Verlauf der Infektion zu, war aber um etwa das 100fache geringer als bei einer vergleichbaren Infektion von Vero-Zellen. Das freigesetzte Virus ist infektiös genug, um bei Vero-Zellen eine CDV-Infektion zu verursachen, kann aber anscheinend noch uninfizierte LoVo-Zellen nicht effizient infizieren. Dies könnte an dem nur geringen Anteil an aktiviertem F-Protein auf der virale Hülle liegen. Da das Virus an Vero-Zellen adaptiert ist, ist die geringere Menge eventuell ausreichend für eine Infektion von Vero, aber nicht von LoVo-Zellen.

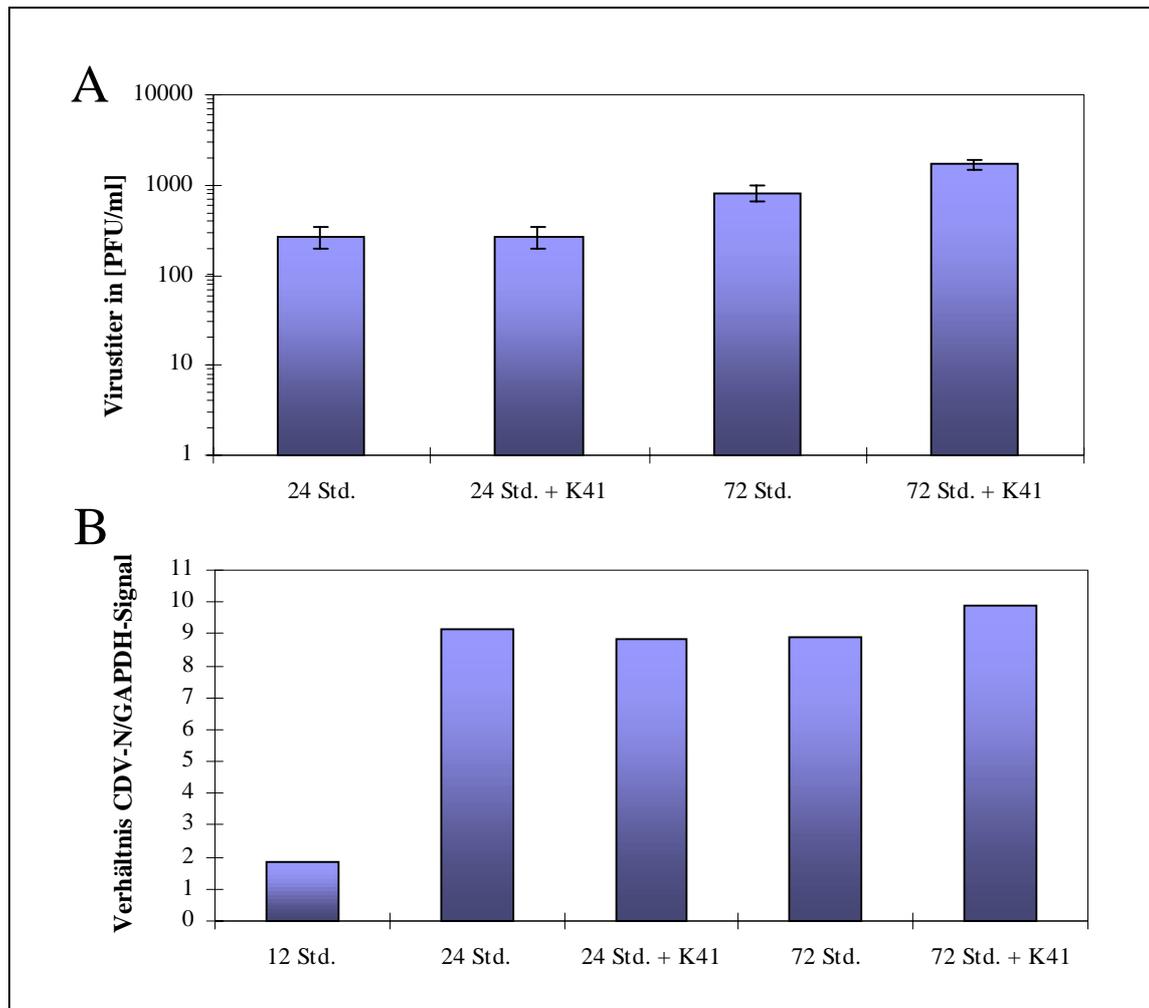


Abb. 4.20: Wirkung von CD9-Antikörper K41 auf die CDV-Infektion in Furin-defizienten LoVo-Zellen. LoVo-Zellen wurden mit CDV MOI = 0,2 infiziert und ein Teil der Ansätze nach 12 Stunden teilweise mit mAK K41 behandelt. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde der Titer des freigesetzten Virus in den einzelnen Ansätzen durch Titration auf Vero-Zellen bestimmt (A). Gleichzeitig wurde die RNA der Zellen isoliert und ein Northern Blot erstellt. Mit radioaktiv markierten Sonden wurde dann die mRNA von CDV-N und GAPDH detektiert, im Phosphor-Imager quantifiziert und als Verhältnis des CDV-N/GAPDH-Signals dargestellt (B).

4.6 Der Hemmeffekt von anti-CD9-Antikörpern ist abhängig vom verwendeten CDV-Stamm

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten CDV-Stämme sind alle Impfstämme oder Zellkultur-adaptierte Wildstammisolate. Aufgrund ihrer unterschiedlichen zytopathischen Effekte auf Vero-Zellen kann man diese Virus-Stämme in zwei Gruppen einteilen. Dies sind zum einen die Gruppe der synzytiuminduzierenden (SI-) Stämme, zum anderen die nicht-synzytiuminduzierenden (NSI-) Stämme. Zu den SI-CDV-Stämmen zählen OND-LP, OND-SP, A75/17-V und BUS, die etwa 18 Stunden nach einer Infektion deutlich sichtbare Synzytien verursachen. Im Gegensatz dazu bilden die CDV-Stämme RB, Dog/NI und HAN2544/95 innerhalb von 24 Stunden nach Infektion keine Synzytien. Erst bei sehr weit fortgeschrittener Infektion, wenn die Zellen zu mehr als 95% durchinfiziert sind, bildet RB

ein paar kleinere Plaques. Die Stämme Dog/NI und HAN2544/95 führen zu keinem Zeitpunkt der Infektion zur Bildung von Plaques. Es ist deshalb anzunehmen, dass sich Infektionen mit NSI-CDV-Stämmen in der Zellkultur hauptsächlich über neusynthetisiertes und freigesetztes Virus ausbreitet, während bei den SI-CDV-Stämmen die Zell-Zell-Fusion im wesentlichen für die Infektionsausbreitung verantwortlich ist.

4.6.1 Persistent mit einem nicht-synzytiuminduzierenden CDV-Stamm infizierte Zellen fusionieren nicht mit uninfizierten Zellen.

Werden HeLa-Zellen, die persistent mit einem NSI-CDV-Stamm infiziert sind, für Experimente mit dem unter 4.5.1 beschriebenen Fusionssystem eingesetzt, so ist selbst nach 48 Stunden keine Zell-Zell-Fusion zwischen uninfizierten und infizierten HeLa-Zellen zu beobachten. Es wurde auch untersucht, ob persistent mit CDV-RB oder CDV-Dog/NI infizierte HeLa-Zellen bei Zugabe zu uninfizierten Zellen zumindest Anzeichen von Hemifusion zeigen. Wie man in Abbildung 4.21 in den ersten 3 Stunden nach Mischung der Zellen keine Hemifusion sichtbar. Im Gegensatz dazu war bei Verwendung persistent CDV-OND infizierter Zellen (Abb. 4.15 A) zu diesem Zeitpunkt neben Hemifusion schon erste Synzytien zu sehen. Leider ist bei der Untersuchung von Hemifusionsvorgängen mittels Rhodamin R18 nur in den ersten 3 Stunden eine deutliche Identifikation der Hemifusionen möglich. Es ist deshalb nicht auszuschließen, dass die persistent CDV-RB oder CDV-Dog/NI infizierten Zellen eine langsamere Fusionskinetik aufweisen und mit uninfizierten Zellen erst zu deutlich späteren Zeitpunkten eine Hemifusion eingehen.

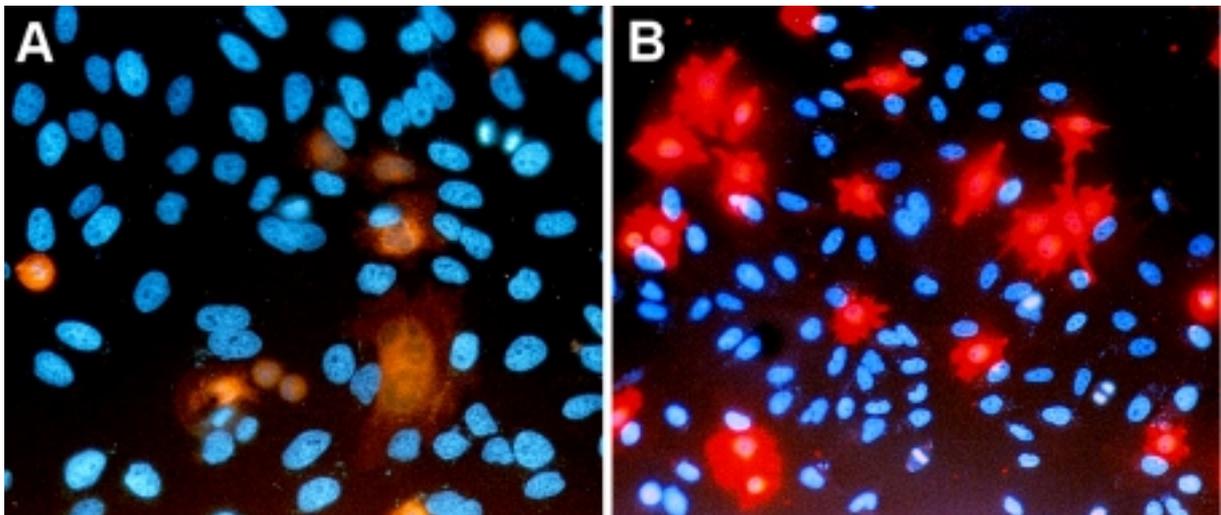


Abb. 4.21: Untersuchung der Hemifusion zwischen uninfizierten HeLa-Zellen und persistent RB oder Dog/NI infizierten HeLa. Persistent infizierte HeLa (A: RB, B: Dog/NI) wurden mit R18 und uninfizierte HeLa mit Hoechst H33258 gefärbt. Nach Mischung der infizierten und uninfizierten Zellen im Verhältnis 1:5 wurden die Ansätze 3 Stunden bei 37°C kultiviert. Die abgebildeten fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen sind Doppelbelichtungen mit jeweils einem Filter für R18 und Hoechst H33258.

4.6.2 Anti-CD9-Antikörper hemmen nicht die Infektion der NSI-CDV-Stämme

Ein Vergleich der Infektion von Vero-Zellen mit diesen CDV-Stämmen in An- oder Abwesenheit von mAK K41 ergab, dass die Virusausbreitung aller synzytiuminduzierenden Stämme drastisch durch mAK K41 gehemmt wurde, während die Ausbreitung und die Expression viraler Antigene in Kulturen von nicht-synzytiuminduzierenden CDV-Stämmen nicht inhibiert wurde.

Um die Wirkung von CD9-Antikörpern auf die Infektionsausbreitung von NSI-CDV-Stämmen zu testen wurden Vero-Zellen mit dem Rockburn-Stamm (RB) mit einer MOI von 0,01 infiziert und in An- oder Abwesenheit von mAK K41 für 7 Tage kultiviert. Dabei wurde eine Stunde nach Infektion K41 in einer Konzentration von 12 $\mu\text{g/ml}$ zugegeben und dann alle 24 Stunden nochmals 6 $\mu\text{g/ml}$ um degradiertes oder internalisiertes K41 zu ersetzen. Die Analyse der Infektion erfolgte auf Einzelzellebene (Durchflußzytometer) durch Messung der Nukleo-Protein (N)-Expression (Abb. 4.22) oder Messung der Expression der viralen Hüllproteine H und F.

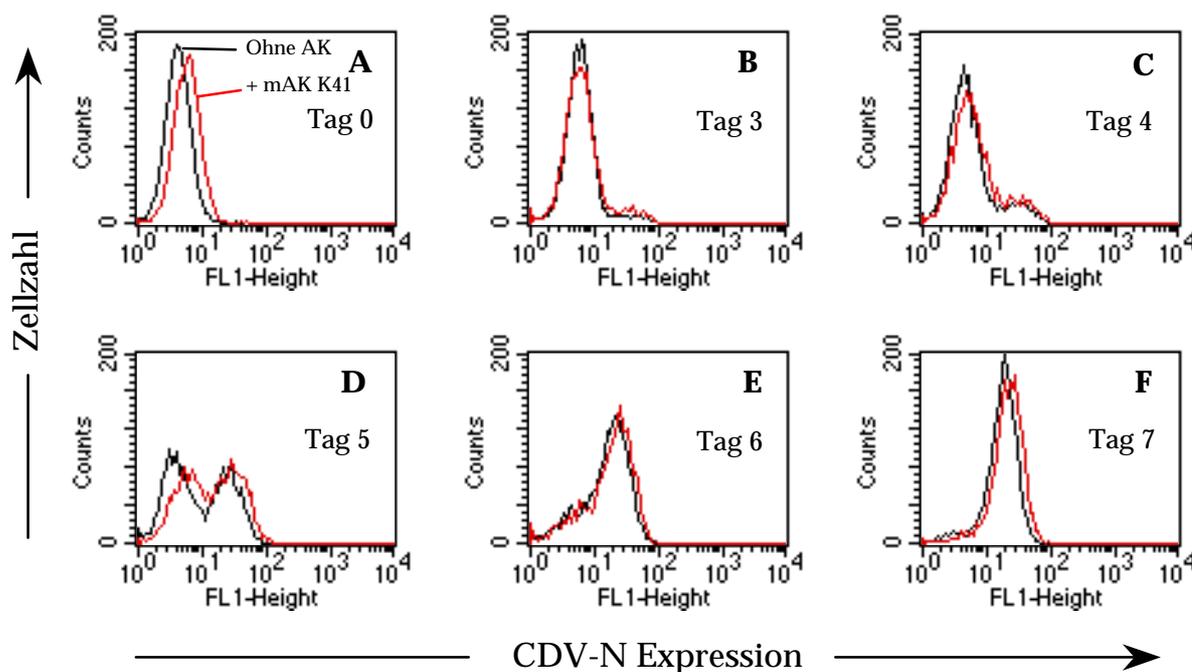


Abb. 4.22: Wirkung der CD9-Antikörper auf den Verlauf einer Infektion von Vero-Zellen mit dem CDV-Stamm Rockburn (RB). Vero-Zellen wurden mit dem nicht-synzytiuminduzierenden CDV-Stamm RB (MOI = 0,01) eine Stunde infiziert. Danach wurde 12 $\mu\text{g/ml}$ mAK K41 zugegeben und alle 24 Stunden nochmals 6 $\mu\text{g/ml}$. Die Ausbreitung der Infektion wurde nach Färbung der Zellen mit einem biotinylierten Antikörper gegen das CDV-N-Protein im Durchflußzytometer 0, 3, 4, 5, 6 und 7 Tage nach Infektion analysiert. Dabei spiegelt sich die Infektionsausbreitung in einer Verschiebung des Signals hin zu größeren Fluoreszenzwerten wieder. Die schwarzen Kurven geben das CDV-N-spezifische Signal in Abwesenheit und die roten Kurven das Signal in Anwesenheit von mAK K41 wieder.

An Abbildung 4.22 kann man erkennen, dass sich der Verlauf der Infektion anhand der Expression des N-Proteins gut verfolgen läßt. Während 3 Tage nach Infektion nur in wenigen Zellen das Nukleo-Protein nachzuweisen war, waren an Tag 5 bereits ca. 50% der Zellen

infiziert und an Tag 7 nahezu alle Zellen. Wie die Kurven zeigen, hatte der mAK K41 dabei keinen hemmenden Einfluß auf die Infektion, da sich keine Unterschiede in der N-Proteinkonzentration von anti-CD9-behandelten und unbehandelten Zellen ergaben. Ebenso verhielt es sich, wenn im Verlauf der Infektion die Expression der viralen Hüllproteine (H und F) mit Hilfe eines polyklonalen Hyperimmunserums analysiert wurden. Auch hier nahm die Expression kontinuierlich zu, ohne das Unterschiede zwischen den K41-behandelten und unbehandelten Ansätzen auftraten. Der im Vergleich mit den SI-CDV-Stämmen sehr langsame Verlauf der Rockburn-Infektion liegt daran, dass sich hier die Infektion vermutlich nur über freigesetztes Virus und nicht über die schnelle Zell-Zell-Fusion ausbreitet. Da K41 keine Verzögerung der Infektion hervorruft, kann angenommen werden, dass die Freisetzung und Aufnahme von infektiösem CDV-Rockburn nicht durch CD9-Antikörper reduziert wird. Experimente mit den NSI-CDV-Stämmen Dog/NI und HAN2544/95 ergaben, das CD9-Antikörper bei diesen Stämmen ebenfalls keinen Effekt auf die Ausbreitung der Infektion haben. Eine Hemmung der Infektion durch anti-CD9-Antikörper erfolgt also offenbar nur bei solchen CDV-Stämmen, deren Ausbreitung im wesentlichen auf der viral induzierten Zell-Zell-Fusion beruht.

4.7 Wirkung von mAK K41 auf die Virusproduktion persistent infizierter Zellen

Persistent mit CDV infizierte HeLa-Zellen zeigen unabhängig vom verwendeten CDV-Stamm in der Kultur keinen zytopathischen Effekt. Trotzdem produzieren, wie bereits erwähnt, persistent mit einem SI-Stamm infizierte Zellen infektiöses, synzytieninduziertes Virus. Es stellte sich die Frage, ob die Virusproduktion persistent mit SI-CDV-Stämmen infizierter Zellen durch die Zugabe von CD9-Antikörpern beeinträchtigt wird.

8×10^6 persistent CDV-infizierte HeLa-Zellen (pOND-LP, pBUS, pOND-SP oder pA75/17-V) wurden pro Ansatz ausgesät. Nach 16 Std. wurde das Kulturmedium durch MEM mit 2% FCS ersetzt und zu einem Teil der Ansätze zusätzlich mAK K41 (12 µg/ml) gegeben. Nach weiteren 24 bzw. 48 Stunden wurde zellfreies und zellgebundenes Virus durch einen Zyklus Einfrieren/Tauen geerntet. Der Titer des geernteten Virus wurde dann pro Ansatz durch Endpunkttitration auf Vero-Zellen bestimmt.

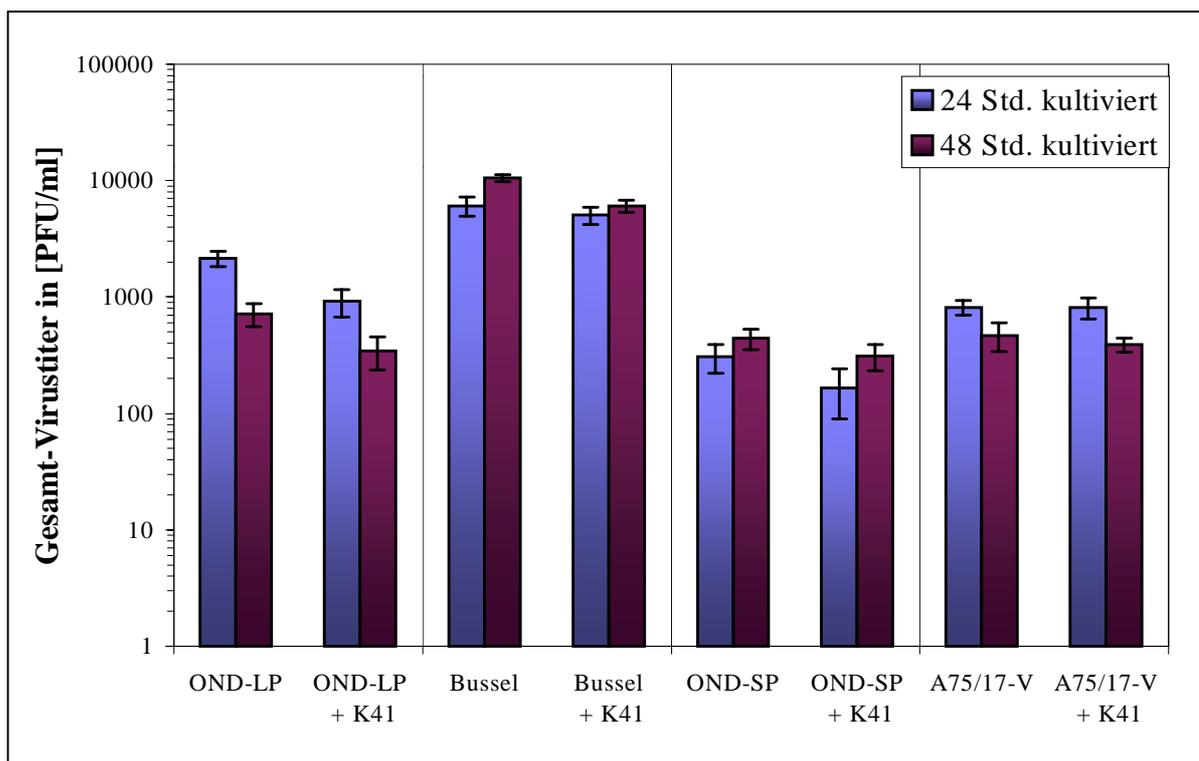


Abb. 4.23: Virusproduktion persistent infizierter HeLa-Zellen in Gegenwart von mAK K41. Persistent infizierte HeLa wurden in An- oder Abwesenheit von mAK K41 (12 µg/ml) für 24 bzw. 48 Std. kultiviert. Durch Titration auf Vero-Zellen wurde der Gesamt-Virustiter der Ansätze ermittelt.

Es zeigte sich, wie aus Abbildung 4.23 ersichtlich, dass im Verhältnis zur großen Anzahl an persistenten Zellen in den Ansätzen nur geringe Virustiter zu messen waren, die meist sogar unter 1000 PFU/ml lagen. Da auch zwischen den 24 und 48 Std. kultivierten Ansätzen die Titer nicht deutlich anstiegen, sondern nahezu gleich blieben, scheint die Virusproduktion in den persistent infizierten Zellen sehr gering zu sein. Zwischen den mit mAK K41 behandelten und unbehandelten Ansätzen bestehen hinsichtlich der Virustiters nur marginale Unterschiede. Die geringfügig kleineren Titer der K41-behandelten Zellen sind eher auf die leichte Hemmung der Zellproliferation (vgl. 4.1.4) durch den CD9-Antikörper als auf eine Hemmung der Virusproduktion zurückzuführen. CD9-Antikörper haben anscheinend nur eine Wirkung bei primären Infektionen, die mit Plaquebildung einhergehen, und nicht bei persistierenden CDV-Infektionen.

4.8 Untersuchungen zur Proliferationshemmung von Lymphozyten mit CDV

Für das mit CDV verwandte Masernvirus wurde gezeigt, dass der direkte Kontakt zwischen den viralen Hüllproteinen (H/F-Komplex) auf einem Viruspartikel oder einer infizierten Zelle (Presenter Zelle) mit Lymphozyten (Responder Zelle) zu einer Proliferationshemmung der Lymphozyten führt (Schlender et al., 1996). Hinsichtlich der Proliferationshemmung *in vitro* bestand dabei kein signifikanter Unterschied zwischen Masern-Vakzine und Wildstämmen.

Es sollte geprüft werden, ob auch CDV-Partikel oder persistent CDV-infizierte Zellen die Proliferation humaner Lymphozyten hemmen und ob es zwischen den SI- und NSI-CDV-Stämmen Unterschiede bezüglich der Fähigkeit zur Proliferationshemmung gibt.

4.8.1 UV-inaktiviertes CDV hemmt die Proliferation humaner Lymphozyten

Durch UV-Bestrahlung inaktiviertes CDV (OND-LP) wurde in verschiedenen Verhältnissen (MOI 1, 0.5, 0.1 und 0.05) mit Phytohämagglutinin (PHA)-stimulierten humanen Lymphozyten gemischt und die Inkorporation von ^3H -Thymidin als Maß für die Proliferation gemessen.

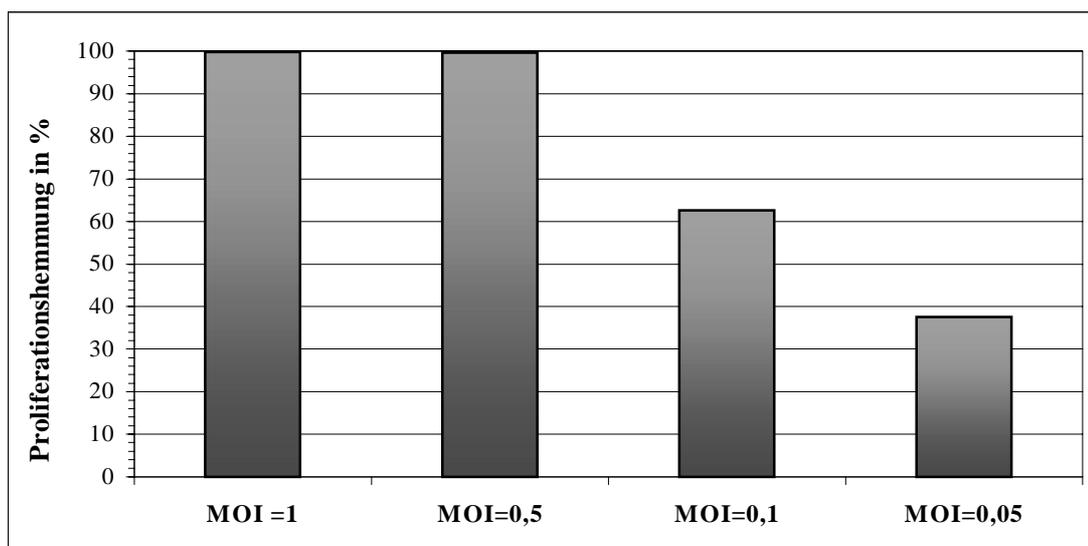


Abb. 4.24: Proliferationshemmung von Lymphozyten durch Viruspartikel (CDV OND-LP). UV-inaktiviertes CDV wurde mit PHA-stimulierten Lymphozyten für 48 Std. kokultiviert. Die Proliferation der Zellen wurde dann über den Einbau von ^3H -Thymidin (24 Std.) bestimmt. Dargestellt ist die Hemmung der Proliferation von mit CDV kokultivierten Lymphozyten gegenüber unbehandelten Lymphozyten.

Wie in Abbildung 4.24 dargestellt, war CDV OND-LP in der Lage die Proliferation von PHA-stimulierten Lymphozyten zu hemmen. Bei Versuchen mit CDV-Rockburn als einem Vertreter der NSI-CDV-Stämme war ebenfalls eine Proliferationshemmung meßbar.

4.8.2 Proliferationshemmung von Lymphozyten mit persistent infizierten HeLa-Zellen

Um zu testen, ob auch die viralen H/F-Komplexe auf persistent CDV-infizierten Zellen die Proliferation humaner Lymphozyten hemmen, wurde diese in verschiedenen Verhältnissen mit UV-bestrahlten HeLa-Zellen, die persistent mit verschiedenen CDV-Stämmen infiziert waren, gemischt. Als Vertreter der SI-CDV-Stämme wurden persistent mit A75/17-V und BUS infizierte HeLa und als Vertreter der NSI-Stämme persistent RB oder Dog/NI infizierte HeLa-Zellen verwendet. Die Proliferation der Lymphozyten wurde dann anhand der ^3H -Thymidin-Inkorporation bestimmt.

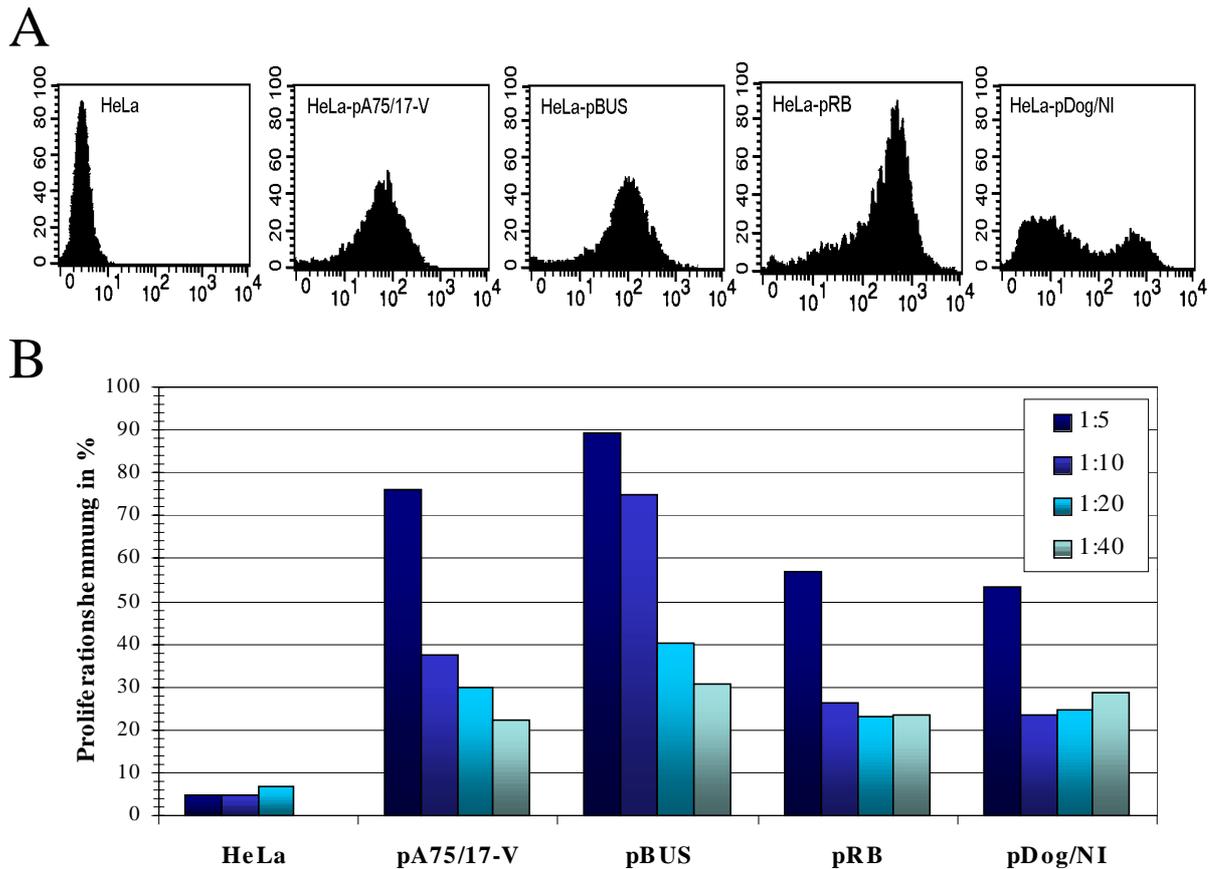


Abb. 4.25: Hemmung der Proliferation humaner Lymphozyten durch Kontakt mit persistent CDV-infizierten HeLa-Zellen. (A) Kontrollfärbung der Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das CDV-H-Protein und Bestimmung der CDV-H-Expression im FACS. (B) Unterschiedliche Mengen UV-inaktivierter, persistent infizierter HeLa-Zellen wurden 72 Std. mit humanen Lymphozyten kokultiviert (im Verhältnis 1:5, 1:10, 1:20 und 1:40). Während der letzten 24 Std. wurde die Proliferation der Lymphozyten über den ^3H -Thymidineinbau gemessen.

Die Ergebnisse der Kontrollfärbung (Abb. 4.25 A) zeigen, dass alle persistent infizierten HeLa-Zellen deutliche Mengen des CDV-H-Proteins auf der Oberfläche exprimierten. Die H-Expression war auf den HeLa pRB-Zellen allerdings deutlich stärker als auf den mit den SI-CDV-Stämmen infizierten Zellen. Das hatte aber keinen höheren proliferationshemmenden Effekt zur Folge (Abb. 4.25 B). Vielmehr lag die Proliferationshemmung der CDV-Stämme A75/17-V und BUS mit 78 bzw. 89% beim Mischungsverhältnis 1:5 etwas höher als das der beiden NSI-Stämme. Diese bewirkten aber auch eine deutliche Hemmung der Lymphozytenproliferation von etwa 55%. Mit abnehmendem Verhältnis von infizierten Zellen zu Lymphozyten sank die Proliferationshemmung aller CDV-Stämme dann auf 20 - 30% ab. Verglichen mit der für MV-Edmonston beschriebenen Hemmung der Proliferation fällt diese bei CDV etwas schwächer aus.

4.9 Untersuchungen zur Beteiligung anderer fusionsregulierender Moleküle an der CDV-induzierten Zell-Zell-Fusion

Wie die Ergebnisse dieser Dissertation zeigen, ist CD9 an der Regulierung der CDV-induzierten Zell-Zell-Fusion beteiligt. Daneben wurden vor einigen Jahren fusions-regulierende Proteine (FRP-1 und FRP-2) beschrieben (Ito et al., 1987; Ito et al. 1992), die u.a. bei verschiedenen Paramyxoviren Einfluß auf die Virus-vermittelte Zell-Zell-Fusion haben (Okamoto et al., 1997): Monoklonale Antikörper gegen FRP-1 stimulieren die Newcastle Disease Virus (NDV)-induzierte Zell-Zell-Fusion in HeLa-Zellen, hemmen aber die Parainfluenzavirus Typ 2-induzierte Synzytienbildung. Da sowohl FRP-1 (Ohta et al., 1994) als auch CD9 (Rubinstein et al., 1994, 1997) funktionell mit Integrinen assoziiert sind, könnten mechanistische Zusammenhänge oder parallele Regulationsmechanismen zwischen FRP-1 und CD9-regulierten Zellfusionen bestehen.

Es sollte deshalb geklärt werden, ob Antikörper gegen FRP-1 auch die CDV-induzierte Zellfusion beeinflussen und ob sie evtl. die Wirkung von CD9-Antikörpern verstärken oder vermindern. Desweiteren sollte mit Arg-Gly-Asp-enthaltenden Peptiden getestet werden, ob Integrine, die an die RGD-Sequenz binden, an der CDV-Infektion und der Synzytienbildung beteiligt sind.

4.9.1 Beteiligung von FRP-1 bei der CDV-induzierte Zellfusion ?

FRP-1 ist identisch mit der schweren Kette des 4F2/CD98-Moleküls, das aus einem über eine Disulfidbrücke verbundenen Heterodimer aus einer 80-90 kDa und einer 35-40 kDa schweren Kette besteht. Zur Klärung der Frage, inwiefern 4F2/CD98 bei der CDV-Infektion an der Zellfusion beteiligt ist, wurde untersucht, welchen Effekt anti-CD98-Antikörper auf die Synzytienbildung haben.

4.9.1.1 Wirkung von FRP-1 und CD9-Antikörper auf die NDV-induzierte Zell-Zell-Fusion

In ersten Vorversuchen wurde getestet, ob die von Prof. Ito zur Verfügung gestellten FRP-1-Antikörper (mAK 6-1-14, mAK 4-5-1 und mAK HBJ 127) auch bei den in unserem Labor verwendeten HeLa-Zellen und dem NDV-Stamm (Italia) die Synzytienbildung beschleunigen und welchen Effekt CD9-Antikörper auf die NDV-Infektion von HeLa-Zellen haben. Dazu wurden HeLa-Zellen mit NDV (MOI = 0,2) für 1 Std. bei 37°C infiziert. Nach der Infektion wurden die FRP-1-Antikörper (5 µg/ml), mAK K41 (12 µg/ml) oder mAK 13/42 (10 µg/ml), als Kontrolle, dem Medium beigegeben. Die Dosierung der FRP-1-Antikörper folgte dabei den laut Publikationen effektiven Konzentrationen. 12 und 18 Stunden nach Infektion wurden

die verschiedenen Ansätze nach einer Giemsa-Färbung im Lichtmikroskop untersucht. Von zwei Beobachtern wurde dann die Zell-Zell-Fusion anhand des Anteils der Synzytien-Fläche an der gesamten Kulturfläche bewertet.

Antikörper	Spezifität	Ausmaß der Zell-Zell-Fusion	
		12 Std. n.I.	18 Std. n.I.
HBJ 127	α -4F2/CD98	+++	++++
4-5-1	α -4F2/CD98	++	++++
6-1-14	α -4F2/CD98	++	++++
K41	α -CD9	+++	+++++
13/42	α -CD46	-	+
Ohne AK	-	-	+

Tabelle 4.2: Wirkung von FRP-1 und CD9-Antikörpern auf die NDV-induzierte Zell-Zell-Fusion von HeLa-Zellen. Für die Bestimmung des Ausmaßes der Synzytienbildung wurden folgende Bewertungskriterien benutzt, die sich am Anteil der Synzytien an der Kulturfläche orientieren: „-“ = keine Plaques; „+“ = Plaquefläche < 10%; „++“ = Plaquefläche beträgt 10-30%; „+++“ = 30-50%; „++++“ = 50-80% und „+++++“ = Plaquefläche > 80%.

Die Tabelle 4.2 zeigt, dass die FRP-1-Antikörper wie publiziert die Zell-Zell-Fusion NDV-infizierter HeLa-Zellen stark förderten, während der Kontrollantikörper 13/42 keinen Einfluß auf die Synzytienbildung hatte. Verblüffend war, dass auch der mAK K41 die NDV-vermittelte Zell-Zell-Fusion beschleunigte und das sogar teilweise etwas besser als die FRP-1 mAK. CD9 ist also bei NDV ebenfalls an der Regulation der Zellfusion beteiligt, hat aber hier im Gegensatz zu CDV einen fusionsfördernden Effekt. CD9 ist also wie 4F2/CD98 an der Regulation der Virus-induzierten Zell-Zell-Fusion beteiligt und kann abhängig vom Virus-Zell-System die Zellfusion sowohl verstärken als auch hemmen.

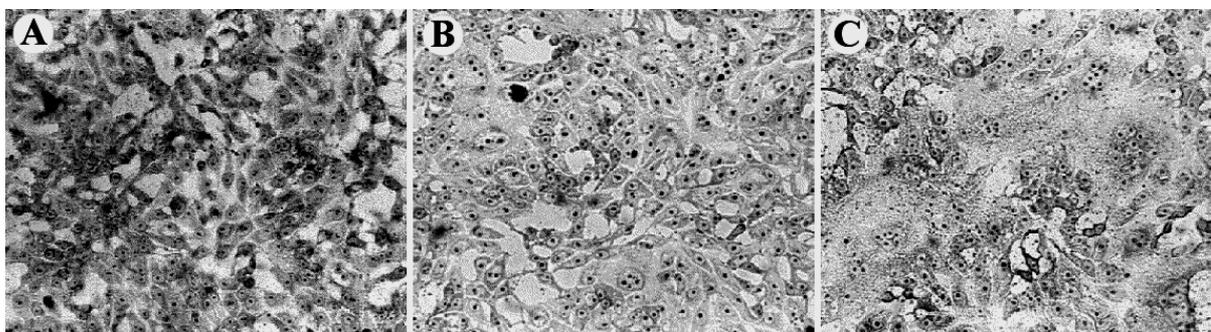


Abb. 4.26: Wirkung von FRP-1 und CD9-Antikörper auf die NDV-induzierte Zell-Zell-Fusion 18 Std. nach Infektion. Vero-Zellen wurden mit NDV (MOI = 0,2) infiziert und nach der Infektion mit FRP-1-Antikörpern (5 μ g/ml), mAK K41 (12 μ g/ml) oder mAK 13/42 (10 μ g/ml; Kontrolle) behandelt. Als Beispiel sind Aufnahmen von unbehandelten (A), sowie mit dem FRP-Antikörper 6-1-14 (B) oder mAK K41 (C) behandelten NDV-infizierten Zellen abgebildet (Vergrößerung 1:100).

Um zu testen, ob die Wirkung der FRP-1 und des CD9-Antikörpers spezifisch nur bei NDV-infizierten HeLa-Zellen (humane Zelllinie) auftritt, wurden auch Versuche mit Vero-Zellen (Affenzelllinie) durchgeführt. Dazu wurden Vero-Zellen mit unterschiedlichen MOI's von NDV (0,1 und 0,5) infiziert und eine Stunde nach Infektion wie bereits beschrieben die FRP-1 mAK oder mAK K41 ins Medium gegeben. 18 Stunden nach Infektion wurde dann die Synzytienbildung in den einzelnen Ansätzen im Mikroskop bestimmt (Abb. 4.26; Tab. 4.3). Zusätzlich wurde im Durchflußzytometer die Expression der von den Antikörpern erkannten Epitope auf den HeLa- und Vero-Zellen gemessen. Dabei wurden die Antikörper 1:100 verdünnt eingesetzt (~ 5 µg/ml) und mit einem FITC gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen.

Antikörper	Ausmaß der Zell-Zell-Fusion		Epitop-Expression [MFI]	
	MOI = 0,1	MOI = 0,5	Vero-Zellen	HeLa-Zellen
Ohne AK	+	++	-	-
HBJ 127 (α -CD98)	+++	+++	89,8	805,8
4-5-1 (α -CD98)	+++	++++	119,7	749,9
6-1-14 (α -CD98)	++++	++++	184,3	1240,9
K41 (α -CD9)	+++++	+++++	143,3	45,3

Tabelle 4.3: Wirkung von FRP-1 und CD9-Antikörpern auf die NDV-induzierte Zell-Zell-Fusion von Vero-Zellen und Expression von CD98 und CD9 auf Vero- und HeLa-Zellen. Für die Bestimmung des Ausmaßes der Synzytienbildung wurden folgende Bewertungskriterien benutzt, die sich am Anteil der Synzytien an der Kulturfläche orientieren: „-“ = Plaquefläche < 10%; „+“ = Plaquefläche beträgt 10-30%; „++“ = 30-50%; „+++“ = 50-80%; „++++“ = Plaquefläche > 80% und „+++++“ = alle Zellen zu einem einzigen Synzytium fusioniert. Die Expression der von den Antikörpern erkannten Epitope auf uninfizierten Zellen wird durch die im FACS ermittelte mediane Fluoreszenzintensität wiedergegeben. Im Immunfluoreszenzmikroskop war dabei zu erkennen, dass CD98 bei beiden Zelllinien nur auf der Zelloberfläche nachzuweisen und gleichmäßig über diese verteilt ist.

Auch bei der NDV-Infektion von Vero-Zellen zeigen sowohl mAK K41 und FRP-1 mAK eine Beschleunigung bzw. Verstärkung der Zell-Zell-Fusion. Dabei begann die Synzytienbildung in der mit CD98-Antikörpern behandelten Kulturen zu einem späteren Zeitpunkt als in den NDV-infizierten HeLa-Kulturen. Während in der HeLa-Kultur schon 12 Stunden nach Infektion deutliche Synzytien gebildet wurden, traten deutliche Plaques bei Verwendung von Vero-Zellen erst 15 Stunden nach Infektion auf. Insgesamt fiel der fusionsfördernde Effekt der FRP-1-Antikörper bei Vero-Zellen etwas geringer aus als bei HeLa-Zellen. Die Ursache dafür könnte der Umstand sein, dass die FRP-1-Epitope zwar auf der Oberfläche der beiden Zelllinien in deutlichen Mengen vorhanden sind, die Expression aber auf den HeLa-Zellen stärker ist als auf den Vero-Zellen (Tab. 4.3). Der CD9-Antikörper zeigte auch bei Vero-Zellen eine starke Förderung der Zellfusion, die schon (wie bei den HeLa-Zellen) 12 Stunden

nach Infektion mit CDV deutliche Plaques entstehen lies. Pauschal war der fusionsfördernde Effekt der CD9-Antikörper etwas stärker als der Effekt der FRP-1-Antikörper.

Abschließend wurde untersucht wie groß die K41-Konzentration sein muss, um bei NDV-infizierten Vero-Zellen die Zell-Zell-Fusion noch deutlich zu beschleunigen bzw. zu verstärken. Dazu wurde zu NDV-infizierten Vero-Zellen mAK K41 in abnehmenden Konzentrationen (10 – 0,1 µg/ml) gegeben. Zum Vergleich wurde der FRP-1 mAK 4-5-1 in einer Konzentration von 10 µg/ml eingesetzt. 20 Stunden nach Infektion wurde dann die Plaquefläche bestimmt.

Antikörper	Konzentration	Plaquefläche 20 Std. n.I.	
		MOI = 0,05	MOI = 0,1
Ohne AK		30%	35%
mAK K41	10 µg/ml	100%	95%
mAK K41	7,5 µg/ml	95%	90%
mAK K41	5 µg/ml	95%	90%
mAK K41	2,5 µg/ml	95%	100%
mAK K41	1 µg/ml	95%	85%
mAK K41	0,5 µg/ml	60%	65%
mAK K41	0,1 µg/ml	65%	55%
mAK 4-5-1	5 µg/ml	65%	70%

Tabelle 4.4: Mindestkonzentration an mAK K41 zur Förderung der NDV-induzierten Zellfusion bei Vero-Zellen. Beobachtung der Synzytienbildung bei NDV-infizierten Vero in Gegenwart abnehmender Mengen von CD9-Antikörpern 20 Stunden nach Infektion.

Wie aus Tabelle 4.4 ersichtlich, war die K41-Konzentration, die für einen deutlichen Effekt auf die NDV-vermittelte Zellfusion mindestens benötigt wurde, mit 0,1 µg/ml um das etwa 100fache geringer als die Konzentration, die man benötigt um bei CDV eine Fusionshemmung zu bewirken. Daraus läßt sich schließen, dass CD9 bei CDV und NDV über zwei unterschiedliche Mechanismen an der Regulierung der Zell-Zell-Fusion beteiligt ist. Die geringe Menge an K41, die bei NDV für einen ausgeprägten Effekt ausreichend war, legt die Annahme nahe, dass hier durch die Bindung des Antikörpers an CD9 Signalwege ausgelöst werden, die dann eine Beschleunigung der Fusionsvorgänge zur Folge haben. Bei CDV spricht dagegen die relativ hohe K41-Konzentration, die für den Hemmeffekt nötig ist, gegen die Annahme, dass die Hemmung durch Signale ausgelöst wird. Wahrscheinlicher ist, dass durch die Bindung des CD9-Antikörpers die Interaktion von CD9 mit anderen Molekülen beeinflusst wird und es dadurch zur Hemmung der Zellfusion kommt.

4.9.1.2 Wirkung von FRP-1-Antikörpern auf die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion

Im folgenden Versuch wurde untersucht ob die FRP-1-Antikörpern bei CDV-infizierten Zellen ebenfalls Einfluß auf die Virus-induzierte Zellfusion haben. Dazu wurden Vero-Zellen mit CDV (OND-LP) MOI = 0,1 bei 37°C infiziert. Eine Stunde nach Infektion wurden dann die verschiedenen Antikörper ins Kulturmedium gegeben. Die FRP-1-Antikörper wurden in einer Konzentration von 5 µg/ml eingesetzt, mAK K41 und der Kontroll-Antikörper 13/42 mit 12 µg/ml. Um zu testen, ob die FRP-1-Antikörper evtl. auch die Wirkung des CD9-Antikörpers beeinflussen können, wurden zusätzlich Kombinationen der FRP-1 mAK mit mAK K41 verwendet. Die verschiedenen Proben wurden 12, 18 und 24 Stunden nach Infektion im Mikroskop untersucht und die Stärke der Synzytienbildung bewertet.

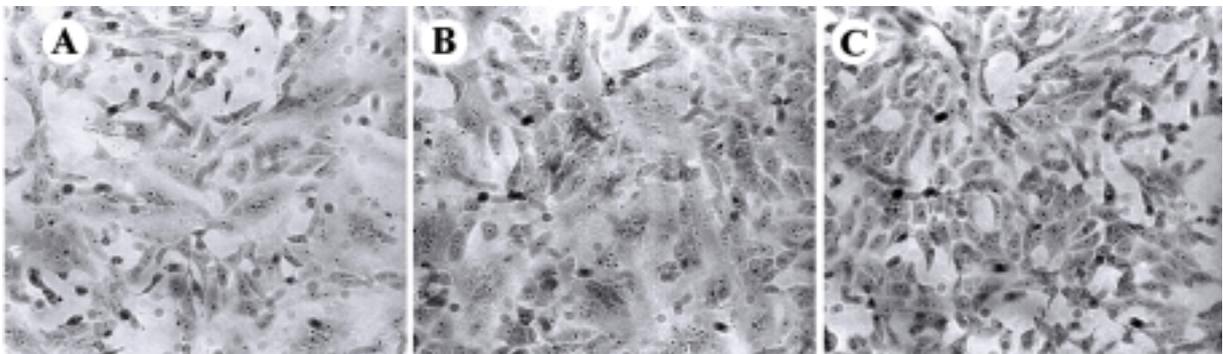


Abb. 4.27: Wirkung von FRP-1 und CD9-Antikörper auf die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion. Vero-Zellen wurden mit CDV (MOI = 0,1) infiziert und nach der Infektion mit FRP-1-Antikörpern (5 µg/ml) oder mAK K41 (12 µg/ml) behandelt. Die abgebildeten sind Aufnahmen zeigen Vero-Zellen 18 Std. nach Infektion mit CDV. In Bild (A) blieben die Zellen unbehandelt, während Bild (B) mit dem FRP-Antikörper 6-1-14 und Bild (C) mit mAK K41 behandelte Zellen zeigt (Vergrößerung 1:100).

Es zeigte sich in den Versuchen kein signifikanter Effekt der FRP-1-Antikörper auf die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion (Abb. 4.27). Aus Tabelle 4.5 ist zu entnehmen, dass die 4F2/CD98-Antikörper die Zellfusion weder deutlich verstärkten noch deutlich hemmten. Auch hatten FRP-1 mAK keinerlei Auswirkung auf die Hemmung der Fusion durch K41 und konnten demnach diese nicht aufheben oder unterstützen. Auch bei Versuchen mit einer höheren oder niedrigeren MOI von CDV von 1 bzw. 0,05 war kein Effekt der FRP-1 mAK auf die Zellfusion oder die Wirksamkeit der CD9-Antikörper feststellbar.

In weiteren zusätzlichen Experimenten wurde untersucht, ob eventuell eine höhere Konzentration von FRP-1-Antikörpern benötigt wird um bei CDV eine Effekt zu bewirken. Aber auch wenn mAK HBJ 127 in einer 10fach höheren Konzentration von 50 µg/ml eingesetzt wurde konnte kein Effekt auf die Zell-Zell-Fusion beobachtet werden.

Auch bei Vero-Zellen, die mit den Masernstämmen Edmonston oder WTF-V infiziert waren, hatten weder die FRP-1- noch der CD9-Antikörper Einfluß auf die viral-induzierte Zell-Zell-Fusion.

Antikörper	Ausmaß der Zell-Zell-Fusion		
	12 Std. n.I	18 Std. n.I	24 Std. n.I
Ohne AK	++	++++	+++++++
K41	-	+	+
13/42	+++	++++	+++++++
HBJ 127	++	++++	+++++++
4-5-1	++	++++	+++++
6-1-14	++	+++++	+++++++
HBJ 127 + K41	-	-	+
4-5-1 + K41	-	+	+
6-1-14 + K41	-	-	+
HBJ 127 + 13/42		++++	+++++
4-5-1 + 13/42		+++++	+++++++
6-1-14 + 13/42		++++	+++++

Tabelle 4.5: Wirkung von FRP-1-Antikörpern und Antikörperkombinationen auf die CDV-induzierte (OND-LP) Zell-Zell-Fusion von Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit CDV-OND-LP (MOI=0,1) infiziert und mit mAK HBJ 127, 4-5-1, 6-1-14 (je 5 µg/ml), mAK K41 oder 13/42 (je 12 µg/ml) versetzt. Für die Bestimmung des Ausmaßes der Synzytienbildung 12, 18 und 24 Std. n.I. wurden folgende Bewertungskriterien benutzt, die sich am Anteil der Synzytien an der Kulturfläche orientieren: „-“ = keine Plaques; „+“ = Plaquefläche < 10%; „++“ = Plaquefläche beträgt 10-30%; „+++“ = 30-50%; „++++“ = 50-80%; „+++++“ = Plaquefläche > 80% und „++++++“ = alle Zellen zu einem einzigen Synzytium fusioniert.

Zuletzt wurde getestet, ob die mit verschiedenen CDV-Stämmen persistent infizierten HeLa-Zellen, die in der Kultur keine Plaquebildung mehr zeigen, durch die Zugabe von FRP-1-Antikörpern (10 µg/ml) ins Medium wieder zur Synzytienbildung angeregt werden können. Es konnte aber unabhängig vom CDV-Stamm kein fusionsinduzierender Effekt der CD98-Antikörper bei den chronisch infizierten HeLa beobachtet werden.

Es ist festzustellen, dass CD98 bei den Morbilliviren CDV und Masern nicht an der Regulation der Zellfusion beteiligt ist und bei CDV-induzierter Fusion nicht mit CD9 interagiert.

4.9.2 Spielen RGD-bindende Integrine bei CDV eine Rolle bei der Virusbindung oder der Zell-Zell-Fusion ?

Es ist bekannt, dass CD9 und andere Mitglieder der Tetraspanin-Familie mit Integrinen assoziieren und interagieren. Integrine spielen eine wichtige Rolle bei der Zellwanderung, Wachstum, Differenzierung und Apoptose. Tetraspanine können die Signalgebung durch Integrinen modulieren und auch das Cytoskelett beeinflussen (Odnitsova et al., 1999). Integrine dienen zudem als Virusrezeptoren und sind an der Fusion von Zellen beteiligt. Es ist somit durchaus möglich, dass CD9 über eine Interaktion mit Integrinen die Infizierbarkeit von Zellen mit CDV erhöht und die CDV-vermittelte Zellfusion beeinflusst. Mehr als die Hälfte

der bekannten Integrine binden an Liganden, die die RGD-Sequenz enthalten. Kurze Peptide, welche die RGD-Sequenz enthalten, werden von solchen Integrinen gebunden, wodurch die Adhäsion der Integrine gehemmt und Signale ausgelöst werden können. In den folgenden Experimenten wurde untersucht, ob RGD-Peptide die Bindung von CDV an Vero-Zellen und die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion beeinflussen.

4.9.2.1 RGD-Peptide haben keinen Einfluß auf die Bindung von CDV an Vero-Zellen

Um zu testen, ob RGD-Peptide einen Effekt auf die Bindung von CDV an die Wirtszelle haben, wurde ein Virusbindungshemmtest durchgeführt. Vero-Zellen wurden 1 Stunde bei RT mit RGD-Peptiden vorinkubiert und dann 1 Stunde bei 4°C mit CDV (MOI=10) inkubiert. Gebundenes Virus wurde mit Hunde-Hyperimmun-Serum gegen CDV detektiert, im Durchflußzytometer gemessen und die mittlere Fluoreszenz-Intensität der Signale in Abwesenheit und Gegenwart der RGD-Peptide verglichen.

Wie der Abbildung 4.28 zu entnehmen ist, hatte die Vorinkubation der Zellen mit 200 µg/ml des RGD-Peptids keine signifikante Änderung der CDV-Bindung zur Folge. Auch Cyclo-RGD-Peptide, die in der Literatur als bis um das 1000fache aktiver als RGD beschrieben sind, beeinträchtigten bei einer Konzentration von 20 µg/ml die Bindung nicht. Das Kontrollpeptid GRGESP, welches laut Literatur keine Bindungsaktivität an Integrine hat, bewirkte einen leichten Rückgang der Virusbindung, der aber in diesem Testsystem nicht signifikant ist.

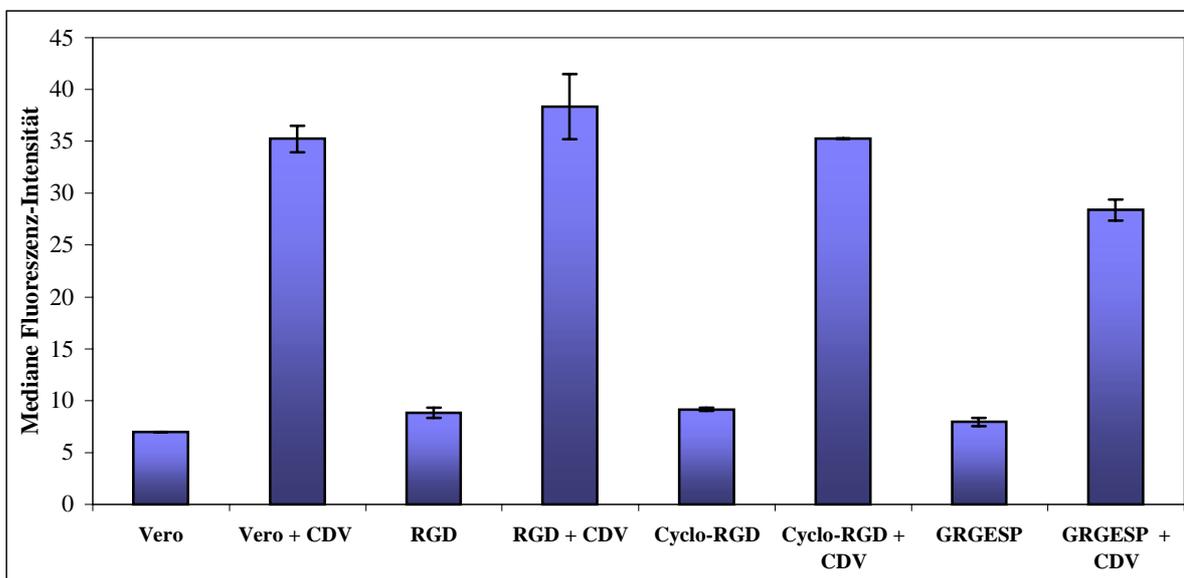


Abb. 4.28: Wirkung von RGD-Peptiden auf die Bindung von CDV an Zellen. Vero-Zellen wurden mit den Peptiden RGD (200 µg/ml), Cyclo-RGD (Cyclo(-Arg-Gly-Asp-D-Phe-Val); 20 µg/ml) und GRGESP (200 µg/ml) 1 Std. vorinkubiert. Der CDV-Stamm OND-LP (MOI=10) wurde dann bei 4°C in Anwesenheit der Peptide mit Vero-Zellen für 1 Std. inkubiert und gebundenes Virus im Durchflußzytometer mit einem polyclonalen Hunde-Hyperimmun-Serum detektiert. Die Bindungssignale zweier Versuche sind als Mittelwerte der medianen Fluoreszenz-Intensität dargestellt.

Neben der Virusbindung wurde auch untersucht, ob die Infizierbarkeit der Vero-Zellen durch RGD-Peptide verändert werden kann. Dazu wurden Zellen mit den Peptiden 1 Stunde bei RT vorinkubiert und anschließend mit CDV-BUS (MOI = 0,1) infiziert. 6 Stunden nach Infektion wurden die Zellen fixiert, mit einem mAK gegen das CDV-N-Protein und einem FITC-konjugiertem Sekundärantikörper gefärbt und im Immunfluoreszenz-Mikroskop die Anzahl der infizierten Zellen bestimmt. Dabei ergaben selbst RGD-Konzentrationen von 1 mg/ml keine signifikant erniedrigte oder erhöhte Anzahl an infizierten Zellen und die Peptide Cyclo-RGD und GRGESP zeigten ebenfalls keinerlei Effekt.

4.9.2.2 Einfluß von RGD-Peptiden auf die Virus-induzierte Zell-Zell-Fusion

Für Versuche zur Klärung der Wirkung von RGD-Peptiden auf die Zellfusion wurden Vero-Zellen mit einer MOI von 0,1 und 0,05 (CDV-OND-LP) infiziert. Danach wurde das RGD-Peptid (250 µg/ml) oder mAK K41 (12 µg/ml) zugegeben. Cyclo-RGD konnte nicht verwendet werden, da Konzentrationen über 10 µg/ml die Adhäsion der Vero-Zellen vollständig aufhoben und zu einer Ablösung der Zellen vom Boden des Kulturgefäßes führten. 17 Stunden nach Infektion wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die Synzytien pro Ansatz im Lichtmikroskop ausgezählt.

Plaquegröße	MOI 0,05			MOI 0,1		
	Unbeh.	RGD	K41	Unbeh.	RGD	K41
2-4 Zellkerne	51	54	4	n.d.	n.d.	5
5-9 Zellkerne	142	132	0	n.d.	n.d.	2
> 10 Zellkerne	37	32	0	n.d.	n.d.	0
Gesamtzahl	230	218	4	412	362	7

Tabelle 4.6: Wirkung von RGD-Peptiden auf die CDV-induzierte (OND-LP) Zell-Zell-Fusion von Vero-Zellen. Vero-Zellen wurden mit CDV-OND-LP (MOI=0,1 oder 0,05) infiziert und mit RGD-Peptiden (250 µg/ml) oder mAK K41 (12 µg/ml) versetzt. 17 Std. nach Infektion wurden die Zellen mit Kristallviolett gefärbt und die Plaques gezählt. Für jede Messreihe wurden dazu 3 Näpfe einer 6-Cluster-Platte ausgewertet und addiert.

Aus Tabelle 4.6 ist zu entnehmen, dass bei der MOI von 0,05 die Anzahl der Synzytien in den unbehandelten Ansätzen nur geringfügig größer war als in den mit dem RGD-Peptid behandelten Ansätzen. Auch die Größenverteilung der Plaques war in beiden Fällen nahezu gleich. Bei einer MOI von 0,1 war die Gesamtzahl der Synzytien in den Ansätzen mit RGD-Peptiden um ca. 10% geringer als in den unbehandelten Proben. Dies könnte zwar auf eine schwache Hemmung der Zell-Zell-Fusion durch RGD-Peptide hinweisen. Es ist aber ebenso möglich, dass es sich um einen unspezifischen Effekt der hohen Peptidkonzentration oder um zufällige Schwankung in der Infektionsausbreitung handelte. Über RGD-Peptide kann also im Falle von CDV kein Einfluß auf die Virusbindung und die viral-induzierte Zellfusion ausgeübt werden.

5. Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Dissertation sollte geklärt werden, welche Bedeutung das Tetraspanin-Molekül CD9 für die Infektion von Zellkulturen mit dem Hundestaube-Virus (CDV) hat. Das Hauptaugenmerk lag dabei vor allem auf der Hemmung der CDV-Infektion durch CD9-Antikörper. Durch schrittweise Untersuchung der im Verlauf einer CDV-Infektion ablaufenden Prozesse sollte der Mechanismus geklärt werden, der hinter der Inhibition der Infektion von Vero-Zellkulturen mit dem CDV-Stamm OND durch Antikörper gegen CD9 steckt. Es stellte sich heraus, dass weder die Virusbindung und Virusaufnahme, noch die virale mRNA- oder Proteinsynthese direkt durch CD9-Antikörper beeinflusst werden. Auch die Modifikation der viralen Proteine, einschließlich der Spaltung des F-Proteins schien ebenso normal abzulaufen wie die Expression der viralen Proteine an der Zelloberfläche. Die Synzytienbildung in infizierten Zellkulturen wurde durch mAK K41 dagegen drastisch gehemmt und auch die Virusfreisetzung von SI-CDV-Stämmen wurde durch CD9-Antikörper beeinflusst. Ein Fusionsassay mit uninfizierten und persistent infizierten HeLa-Zellen ergab, dass mAK K41 direkt die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion hemmt und somit die Bildung von Plaques deutlich reduziert. Auch ähnelt die Reduktion der produzierten Menge an Virionen und viraler mRNA, die zu späten Zeitpunkten nach der Infektion in Gegenwart von mAK K41 zu beobachten war, der Reduktion in Gegenwart eines fusionsinhibierenden Peptids (FIP). Daraus war zu schließen, dass diese Reduktionen höchstwahrscheinlich Sekundäreffekte der Hemmung der Synzytienbildung sind. Die Gesamtheit der ermittelten Daten führt zu der Schlußfolgerung, dass Antikörper gegen CD9 spezifisch die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion hemmen, nicht aber die Virus-Zell-Fusion.

Im Folgenden soll näher auf die Ergebnisse der einzelnen Untersuchungen eingegangen werden und, ausgehend von einem Modell der Fusionsvorgänge bei Paramyxoviren, Hypothesen erstellt und erläutert werden, wie CD9 an zellulären Fusionsvorgängen beteiligt sein könnte.

5.1 CD9 ist nicht an der Virusbindung und Aufnahme beteiligt

Da keine direkte Bindung von CDV an CD9 gezeigt werden konnte, ist eine Funktion von CD9 als hoch affiner Rezeptor auszuschließen (Löffler et al., 1997). Dies wird auch durch Untersuchungen unterstützt, bei denen mittels Mensch-Maus somatischen Hybriden gezeigt wurde, dass ein Gen auf Chromosom 19 die Suszeptibilität humaner Zellen für CDV vermittelt (Stern et al., 1995). Das Gen für humanes CD9 liegt dagegen auf Chromosom 12 (Benoit et al., 1991). Wie die Ergebnisse der in 4.1 beschriebenen Versuche mit verschiedenen CDV-Stämmen und Zelllinien zeigen, besteht auch keine Korrelation zwischen der Expression von CD9 und der Virusbindung oder Infizierbarkeit der Zellen. Gegen eine Funktion von CD9 als primärer Virusrezeptor oder Korezeptor spricht auch, dass mit CD9-Antikörpern weder die Bindung verschiedener CDV-Stämme an Vero-Zellen beeinflusst, noch die Virusaufnahme gehemmt werden kann. Auch für das Katzen-Immundefizienzvirus

(FIV) wurde CD9 zuerst als möglicher Rezeptor identifiziert, da CD9-Antikörper die FIV-Infektion hemmen und zudem die ektopische Expression von CD9 auf CD9-negativen 3201-Zellen zu einer Verstärkung der Infektion mit FIV führt. Aber es war wie im Fall der CDV-Infektion ebenfalls festzustellen, dass einige Zellen trotz guter CD9-Expression nicht infizierbar waren (Hosie et al., 1993; Willet et al., 1994). Neuere Ergebnisse zeigten, dass CD9 kein Rezeptor für FIV ist, da CD9 bei FIV nicht an der Virusbindung und Aufnahme beteiligt ist und CD9-Antikörper die FIV-Infektion ebenfalls in einem Schritt nach der Virusaufnahme hemmen (Willet et al., 1997; Parseval et al., 1997).

Eine Herabregulierung des CD9 von der Zellmembran CDV-infizierter Zellen wäre ein weiterer Hinweis auf eine Rolle des CD9 als Virusrezeptor gewesen. So wurde bei dem nahe verwandten Masernvirus beobachtet, dass es bei einer Infektion mit dem Vakzinestamm Edmonston bei einigen Zelllinien zu einer Herabregulierung des Virusrezeptors CD46 kommt (Naniche et al., 1993, Schneider-Schaulies et al., 1996). Das Humane- und das Affen-Immundefizienzvirus (HIV und SIV) regulieren die Oberflächenexpression von CD4, ihrem primären Rezeptor, ebenso herab, wie EBV seinen Rezeptor CD21 (Piguet et al., 1999, Tedder et al., 1986). Der Abbau des Rezeptors dient dabei der Vermeidung einer Superinfektion bereits infizierter Zellen (Benson et al., 1993). Im Fall der CDV-Infektion war zwar eine Verminderung der CD9-Expression an der Oberfläche von Vero-Zellen zu beobachten, diese trat aber allgemein im Verlauf der Zellkultur sowohl bei CDV-infizierten als auch bei uninfizierten Zellen auf. Mitglieder der Tetraspanin-Proteinfamilie, zu der CD9 gehört, bilden in der Plasmamembran Komplexe mit Adhäsionsmolekülen aus der Familie der Integrine (Hemler et al., 1996, Maecker et al., 1997). Es konnte gezeigt werden, dass sich in unterschiedlichen Zelllinien die Tetraspanine in Adhäsionskomplexen an den Anheftungsstellen von Zelle und extrazellulärer Matrix anhäufen. Diese Kolokalisation von Tetraspaninen und Adhäsionsstrukturen ist besonders ausgeprägt an der Zell-Peripherie. Zudem konnte die Beteiligung von CD9 und anderen Tetraspaninen an dynamischen Adhäsionsvorgängen demonstriert werden (Berditchevski et al., 1999). Die beobachtete Verminderung von CD9 an der Zelloberfläche im Zuge längerer Kultivierungszeiten könnte demnach folgenden Grund haben: Wenn die Zellen nicht konfluent ausgesät werden, ist ein deutliches Abflachen der Zellen auf dem Boden des Kulturgefäßes zu beobachten. Wächst die Zellkultur zu einem konfluenten Zellrasen heran, verringert sich der Platz der einzelnen Zelle, die dann eine mehr sphärische Form annimmt. Dabei ist die Fläche, die eine Zelle im abgeflachten Zustand bedeckt, um das 2-3 fache größer als die Fläche im sphärischen Zustand. Die abgeflachte Zelle muss also eine höhere Anzahl an Adhäsionsstrukturen aufweisen, die dann im Laufe der Zellkultur mit zunehmender Abkugelung der Zelle kontinuierlich zurückgeht. Da CD9 mit Adhäsionsstrukturen assoziiert ist, führt eine Abnahme dieser Strukturen dann evtl. auch zur Verminderung des CD9 an der Zelloberfläche.

Die in den Virusbindungsstudien verwendeten CDV-Stämme sind alle Laborstämme, die an das Wachstum in der Zellkultur, i.e. Vero-Zellkulturen, adaptiert sind und gehen auf Isolate

aus an Hundestaube erkrankten Hunden zurück. Kennzeichen dieser attenuierten Laborstämme ist zum einen, dass sie in einem breiten Spektrum von Wirtszellen vermehrt werden können. Zum anderen kommt es im Zuge der Adaption zu wesentlichen Veränderungen ihrer biologischen Eigenschaften, wobei insbesondere ein Verlust der Virulenz und der Fähigkeit zur persistenten Infektion des ZNS zu nennen sind (Stettler et al., 1997). Es ist mit Zellkulturadaptiertem CDV nicht möglich im Tierexperiment eine Hundestaube-Erkrankung zu verursachen (Hamburger et al., 1991), weshalb die CDV-Stämme Onderstepoort (OND) und Rockburn als Vakzine eingesetzt werden. Dagegen wachsen CDV-Wildstämme, bzw. Wildisolate, nicht in den gebräuchlichen Zellkulturlinien, außer man adaptiert sie über mehrere Wochen durch Blindpassagierung, wonach sie allerdings ihre Fähigkeit, eine Erkrankung *in vivo* zu verursachen, verloren haben. Wildstämme wie CDV A75/17 können deshalb nur in Hunden oder in primären Hunde-Hirnzellkulturen (DBCC) vermehrt werden. CDV-infiziertes Gewebe aus an Staube erkrankten Hunden etabliert in den Astrozyten dieser Hirnzellkulturen sofort nach der Inokulation eine persistente, nicht-zytolytische Infektion (Hamburger et al., 1991, Pearce Kelling et al., 1990). Werden Hunde mit aus DBCC gewonnenem CDV inokuliert, entwickelt sich eine persistente Infektion des ZNS mit neurologischen Läsionen, die sich nicht von der von Hund zu Hund weitergegebenen Staubeerkrankung unterscheidet (Hamburger et al., 1991). Aufgrund dieser Schwierigkeiten beim Umgang und der Vermehrung von Wildtypstämmen wurden Untersuchungen mit dem CDV-Wildstamm A75/17 in Zusammenarbeit mit dem Institut für Tierneurologie in Bern von A. Zurbriggen durchgeführt. Die Hüllproteine des in Hunde-Hirnzellen propagierten Wildtyp-Isolates A75/17 weisen deutliche Unterschiede zu den Hüllproteinen von OND auf (Cherpillod et al., 1999). Auch zeigt sich während der initialen Ausbreitung von A75/17 in DBCC kein cytopatischer Effekt. CDV-infizierte Astrozyten sind dabei untereinander über Zellfortsätze verbunden, in denen virale Antigene nachweisbar waren. Synzytien entwickeln sich langsam und bleiben selbst bei sehr weit fortgeschrittenen Infektionen nach ca. 3 Wochen, wenn nahezu 100% der Zellen infiziert sind, noch intakt (Zurbriggen et al., 1995). Auf der Oberfläche von DBCC erkennt mAK K41 sein Epitop ebenso effizient wie auf Vero-Zellen. Dennoch konnte die Infektion der primären Hirnzellen mit verschiedenen MOIs von CDV-A75/17 nicht durch mAK K41 gehemmt werden. CD9 scheint also bei der Infektion in primären Hunde-Hirnzellkulturen keine Rolle zu spielen.

Der eingeschränkte Wirtszelltropismus von Wildstämmen wie CDV-A75/17 könnte ein Anzeichen dafür sein, dass diese Stämme andere Bindungsrezeptoren benutzen als die Zellkultur-adaptierten Laborstämme. Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten unterschiedlichen Impfstämme zeigten dagegen in den Bindungsexperimenten den nahezu gleichen Zelltropismus (s. 4.1.1). Es ist deshalb zu vermuten, dass sie auch die selben Bindungsrezeptoren verwenden. Auch beim Masernvirus konnte festgestellt werden, dass die Impfstämme an verschiedenste Zelltypen binden und diese infizieren können, während sich die Infektionsfähigkeit der Wildtyp-Stämme auf Lymphozyten zu beschränken scheint (Bartz

et al., 1998, Firsching 1999). Diese Unterschiede im MV-Tropismus können auf unterschiedliche Rezeptorbenutzung zurückgeführt werden (Tatsuo et al., 2000, Erlenhöfer et al., 2001). Bei Infektionsversuchen fiel aber auch auf, dass es Zelllinien gibt, die zwar keine signifikante Bindung von Virus zeigen, aber trotzdem mit CDV infizierbar sind. Raji-Zellen wiesen keine Bindung von Rockburn oder Dog/NI auf, konnten aber dennoch infiziert werden. Jurkat-Zellen waren sogar trotz nicht nachweisbarer Virusbindung mit allen Laborstämmen infizierbar. Dies könnte zum einen daran liegen, dass verschiedene Rezeptoren existieren, die entweder eine hohe oder eine niedrige Affinität für CDV besitzen. Andererseits könnte die Rezeptorkonzentration auf den verschiedenen Zelllinien variieren, wobei dann aber auch eine geringe Konzentration oder Affinität noch zur Virusaufnahme und Infektion reichen müßte. Neben den Rezeptoren, die ja hauptsächlich für die Virusaufnahme benötigt werden, determinieren aber auch andere zelluläre und virale Moleküle, ob es zu einer produktiven Infektion in einem Zelltyp kommt.

5.2 Ermittlung des Schrittes in der Virusreplikation, der durch CD9-Antikörper gehemmt wird

Die Hinweise darauf, dass CD9 nicht ein direkter Bindungsrezeptor oder Ko-Rezeptor für CDV ist, wurden durch die Fähigkeit der CD9-Antikörper unterstützt, die Infektion selbst nach erfolgter Virusaufnahme noch zu hemmen. Wir konnten zeigen, dass mAK K41 den Verlauf der CDV-Infektion verzögert und dabei die Menge an zellassoziertem und zellfreiem Virus über einen weiten Zeitraum um den Faktor 10 bzw. 30 gesenkt wird. Dabei führt selbst eine kurze, einstündige Behandlung bereits infizierter Zellen mit mAK K41 zu einer stärkeren Inhibition der Infektion, als eine K41-Behandlung der Zellen vor der Infektion (4.3). Selbst bei Zugabe der CD9-Antikörper erst 16 Stunden nach der Infektion war der Hemmeffekt stärker als bei Zugabe vor der Infektion. Daraus ergibt sich, dass mAK K41 seinen Hemmeffekt auf die CDV-Infektion in einem späten Stadium der Infektion ausübt. Es ist bekannt, dass Antikörper, welche die CDR3-Domäne von CD4, dem primären Rezeptor für HIV, erkennen, die HIV-Infektion auf der Stufe der Transkription hemmen, aber nicht die Virusaufnahme inhibieren (Benkirane et al., 1993). Die mRNA-Transkription in CDV-infizierten Zellen scheint aber nicht von einer Behandlung mit CD9-Antikörpern betroffen zu sein. Während der primären viralen mRNA-Synthese führte eine Behandlung der infizierten Zellen mit K41 nicht zu einer Verminderung der produzierten mRNA-Menge. Es konnten auch kein Effekt der CD9-Antikörper auf die anschließende Translation der mRNA nachgewiesen werden. Im Rahmen einer einstufigen Wachstumskinetik bewirkte mAK K41 keine signifikante Inhibition der viralen Proteinsynthese. Alle viralen Proteine waren in K41-behandelten und unbehandelten Ansätzen in gleicher Menge vorhanden. Zudem war auch keine Störung der Modifizierung der viralen Proteine erkennbar. Trotz Anwesenheit von K41 wurde das Vorläuferprotein F_0 des Fusionsproteins in die biologisch aktiven Spaltprodukte F_1 und F_2 überführt und es gibt keine Anzeichen für Unterschiede in der Glykosylierung des H-Proteins.

Diese Ergebnisse zeigen, dass CD9-Antikörper die CDV-Infektion in einem posttranslationalen Stadium des viralen Replikationszyklus hemmen. Bei Untersuchung der Virusfreisetzung im Rahmen einer einstufigen Wachstumskinetik stellte sich heraus, dass in Anwesenheit von K41 die Menge an zellassoziertem Virus (SI-CDV) nicht beeinflusst ist, zellfreies Virus dagegen um das 5-10fache reduziert ist. CD9-Antikörper scheinen also zum einen das Virus-Assembly oder die Virusknospung zu behindern bzw. zu verzögern. Gleichzeitig war aber auch, wie auch schon in vorangegangenen Versuchen beobachtet, die Synzytienbildung und somit die Zell-Zell-Fusion deutlich gehemmt. Bei genauer Untersuchung der Wirkung von K41 in Fusionsassays mit persistent infizierten und uninfizierten HeLa-Zellen stellte sich heraus, dass CD9-Antikörper direkt die Fusion von infizierten mit uninfizierten Zellen beeinträchtigen. Diese Hemmung der Fusion konnte durch Infektionsinhibitionsversuche mit dem fusionsinhibierenden Peptid FIP und mAK K41 bestätigt werden. Bei diesen Versuchen zeigte sich, dass die Hemmwirkungen von FIP und mAK K41 nicht additiv sind und diese somit größtenteils auf demselben Mechanismus beruhen. Weitere Indizien für die spezifisch die Fusion hemmende Wirkung von CD9-Antikörpern lieferten unter anderem Experimente mit Furin-defizienten LOVO-Zellen, bei denen es nicht zur CDV-induzierten Zell-Zell-Fusion kommt und die auch keine Hemmung der Infektion durch K41 aufweisen. Auf die Infektion von Zellen mit nicht-synzytieninduzierenden CDV-Stämmen haben CD9-Antikörper generell keine hemmende Wirkung, während aber Infektionen mit allen synzytieninduzierenden Stämmen durch mAK K41 stark inhibiert werden. In persistent mit SI-Stämmen infizierten HeLa-Kulturen, in denen keine Zell-Zell-Fusion mehr zu beobachten ist, führt die Behandlung mit mAK K41 dagegen nur zu einer geringfügig verminderten Virusproduktion. Diese Verminderung ist dabei höchstwahrscheinlich auf den leichten proliferationshemmenden Effekt von mAK K41 zurückzuführen. Anhand dieser Daten kann geschlossen werden, dass CD9-Antikörper spezifisch die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion hemmen, nicht aber die Virus-Zell-Fusion. Eine ähnliche spezifische Hemmung der Synzytienbildung durch Antikörper wurde schon für das humane T-lymphotrope Virus (HTLV) beschrieben (Imai et al., 1993, Fukudome et al., 1992). Interessanterweise sind es gegen CD82 und CD81 gerichtete Antikörper, durch welche die HTLV-induzierte Synzytienbildung gehemmt wird. CD82 und CD81 sind wie CD9 Mitglieder der Tetraspanin-Familie von zellulären Oberflächenmolekülen und evolutionär nahe miteinander verwandt (Maecker et al., 1997). Bei CDV zeigen aber Antikörper gegen andere Tetraspanine wie CD81, CD82 und CD63 keine Wirkung auf die viral induzierte Synzytienbildung (s. 4.9.1.2).

5.3 Modell der Fusionsvorgänge in der Familie der Paramyxoviridae

Die wichtigste Voraussetzung für die Aufnahme umhüllter Viren in die Wirtszelle und die anschließende Ausbreitung von Zelle zu Zelle ist die Fusion der Virushüllmembran mit der zellulären Membran. An diesem Vorgang sind in erster Linie die Hüllglykoproteine HN (bzw.

H bei den Morbilliviren) und F beteiligt. Diese Proteine sind auf der Virushülle in Form einer regelmäßigen, dicht gepackten Anordnung von „Spikes“ organisiert, die aus H-Tetrameren und F-Trimeren bestehen (Morrison et al., 1991, Norrby et al., 1990, Russell et al., 1994).

Bei den Morbilliviren wird die H/F-vermittelte Zellfusion auch durch das Matrixprotein (M) beeinflusst. Rekombinante Masernviren, die aufgrund einer Deletion im M-Gen kein M enthalten, führen zu einer extensiven Synzytienbildung bei gleichzeitiger niedriger Virusproduktion (Cathomen et al., 1998).

Das HN bzw. H-Protein bindet den oder die zellulären Rezeptor(en), wodurch sich das Virus oder die infizierte Zelle an uninfizierte Zellen anheftet. Für Masern und CDV konnte gezeigt werden, dass die Zellspezifität verschiedener Stämme im wesentlichen vom H-Protein determiniert wird (Johnston et al., 1999, Stern et al., 1995). Während für die Fusion das F-Protein absolut notwendig ist, besteht im Bezug auf die Rolle des HN bzw. H-Proteins weniger Klarheit. Für einige Paramyxoviren, speziell SV5, ist die alleinige Expression von F ausreichend für eine effiziente Induktion der Synzytienbildung (Paterson et al., 1985, Horvath et al., 1992). Es wurde auch berichtet, dass unter speziellen Voraussetzungen, wie der Verwendung rekombinanter viraler Glykoproteine das F-Protein des Masernvirus allein eine Membranfusion verursachen kann (Alkhatib et al., 1990). Andere Mitglieder der Paramyxoviridae, darunter die Morbilliviren, benötigen dagegen jedoch für die Membranfusion eine Koexpression von F und HN bzw. H (Morrison et al., 1991, Bousse et al., 1994, Hu et al., 1992, Ebata et al., 1991, Stern et al., 1995). Aufgrund dieser Tatsachen wurden verschiedene Modelle vorgeschlagen, welche die Signifikanz des HN-, bzw. H-Proteins für die Auslösung der Zell-Zell-Fusion zum Inhalt haben (Lamb, 1993, Tanabayashi et al., 1992). Es wird allgemein angenommen, dass es während der Fusion zu einer spezifischen Interaktion zwischen den HN-(H-) und F-Glykoproteinen kommt. Dabei wird postuliert, dass das HN (H), sobald es an seinen zellulären Rezeptor bindet, mit dem F assoziiert und dieses somit zur Kontaktstelle rekrutiert. Diese Assoziation löst eine Konformationsänderung im F aus, wodurch dieses in eine fusogene Form übergeht, die dann eine Insertion des hydrophoben Fusionspeptids in die gegenüberliegende Zellmembran zur Folge hat (Tsurudome et al., 1998). Diesem Modell nach müssen sich die Hüllglykoproteine der Paramyxoviridae für die Zell-Zell-Fusion zu einem neuen fusogenen Oligomer umarrangieren. Für das Masernvirus konnte durch Quervernetzung und „Cocapping“-Studien eine schwache Interaktion zwischen dem MV F- und H-Protein gezeigt werden (Joseph and Oldstone, 1974, Malvoisin and Wild, 1993, Weidmann et al., 2000). Ein weiterer Beweis, der die Annahme einer Interaktion zwischen F und H bei der Fusion unterstützt, sind spezifische Antikörper gegen das MV H-Protein, die nicht die Rezeptorbindung, wohl aber die Fusion inhibieren (Fournier et al., 1997). Einige Studien zeigen, dass die für den Fusionsprozess benötigte spezifische Interaktion der beiden Glykoproteine nur zwischen homologen Paaren von HN (H) und F des gleichen Virusstamms stattfinden kann (Hu et al., 1992, Yao et al., 1997, Morrison et al., 1991): Im Sendai Virus-System kann weder das Influenza HA, noch das HN-Protein eines heterologen Paramyxovirus das

Sendai HN ersetzen (Hemingway et al., 1994, Horvath et al., 1992). Auch beim Masernvirus führt die Expression einer Kombination von funktionellem F und H aus verschiedenen Masern-Isolaten nicht unbedingt zur Fusion der transfizierten Zellen, obwohl die Hüllproteine der einzelnen Isolate untereinander eine Aminosäurenidentität von bis zu 97% aufweisen (Cattaneo and Rose, 1993). Nichtsdestoweniger wurde für Masern und CDV eine intervirale Komplementierung der H- und F-Proteine beschrieben. Die Identität der Aminosäuresequenz beträgt bei diesen beiden Viren zwar nur 36% für das H und 67% für das F. Trotzdem kann aber im Transfektionsexperiment das CDV H gegen das MV H und umgekehrt ausgetauscht werden, ohne dass ein Verlust der Synzytienbildung zu beobachten wäre (Stern et al., 1994). Anscheinend ähnelt sich die Konformation des H-Proteins von CDV und Masern im Bereich der Domäne, die für die H/F-Interaktion wichtig ist, so sehr, dass eine Komplementierung zwischen diesen Virusspezies möglich ist. Die Ermittlung der Domänen, welche ausschlaggebend für die fusionsunterstützende Funktion des HN bzw. H-Proteins sind, gelang durch Versuche mit chimären Proteinen, bei denen bestimmte Proteinsequenzen zwischen verschiedenen Paramyxoviren ausgetauscht wurden (Deng et al., 1995, Tsurudome et al., 1995; Tanabayashi and Compans, 1996). Es stellte sich heraus, dass das membran-proximale Ende der Hämagglutinin-Ektodomäne essentiell für die Interaktion mit dem Fusionsprotein ist. Bei NDV führen Deletionen in diesem Bereich zu einem Verlust der Fusionsaktivität, nicht aber der Bindungsaktivität (Sergel et al., 1993). Darüberhinaus konnte mit verschiedenen Isolaten des humanen Parainfluenza-Virus Typ-1 gezeigt werden, dass der globuläre Kopf des HN-Proteins in die Determinierung der Stärke der Zell-Zell-Fusion involviert ist (Bousse et al., 1995).

Das F-Protein der Paramyxoviridae hat viele Gemeinsamkeiten mit den fusionsvermittelnden Glykoproteinen anderer Virusarten, wie z.B. dem HA von Influenza, gp160 von HIV und SIV, dem Env von Retroviren und dem GP des Ebolavirus (Hernandez et al., 1996, Review): Alle diese Glykoproteine werden als einzelne Polypeptidkette synthetisiert und oligomerisieren im ER zu Trimeren. Intrazelluläre proteolytische Spaltung der Vorläufer-Glykoproteine führt zu einer für die Fusionsaktivität ausschlaggebenden Bildung einer membrandistalen und einer in der Membran verankerten Untereinheit: Das F₂ und F₁ der Paramyxoviridae, HA1 und HA2 bei Influenza, gp120 und gp41 bei HIV und SIV. In allen gespaltenen Fusionsproteinen enthält die membranverankerte Untereinheit einen neuen hydrophoben N-Terminus, der als Fusionspeptid bezeichnet wird und der während der Fusionsprozesse in die Membran der Zielzelle inseriert (Hernandez et al., 1997, Damico et al., 1998). Bei den Paramyxoviridae ist die Sequenz des Fusionspeptids hoch konserviert und besteht aus 25 Aminosäure-Resten, die nahezu alle hydrophob sind (Review: Lamb und Kolakowsky, 1996).

Hepta-Wiederholungs-Domänen (HR = heptad repeat) sind Bereiche eines Peptids mit einer speziellen Aminosäuresequenz, bei der sich hydrophobe Aminosäuren abwechselnd in einem 3er und 4er Abstand wiederholen. Bei Oligomeren ist diese Sequenzfolge charakteristisch für

eine helikal gewundene Quartärstruktur. Das F-Protein der Paramyxoviridae enthält, wie die Fusionsproteine von Retro- oder Influenza-Viren zwei solche HR-Regionen (Buckland und Wild, 1989, Chambers et al., 1990), die als HRA und HRB bezeichnet werden. HRA befindet sich unmittelbar am C-terminalen Ende des Fusionspeptids. Es ist durch etwa 250 Aminosäurenreste von HRB getrennt, welches ein Leuzin-Zipper-Motiv enthält und neben der Transmembrandomäne liegt. Sequenzvergleiche der HR-Domänen zeigen eine relativ hohe Homologie zwischen den verschiedenen Mitgliedern der Paramyxoviridae und sind Hinweise auf eine ähnliche Struktur der verschiedenen F-Proteine (Abb 5.1 B+C). Mutationsanalysen beider HR-Domänen haben ergeben, dass diese Domänen sehr wichtig für die Fusionsaktivität des F-Proteins sind (Buckland et al., 1992, Reitter et al., 1995, Sergel-Germano et al., 1994). Ein Schema der Struktur des F-Proteins von CDV ist in Abbildung 5.1 dargestellt.

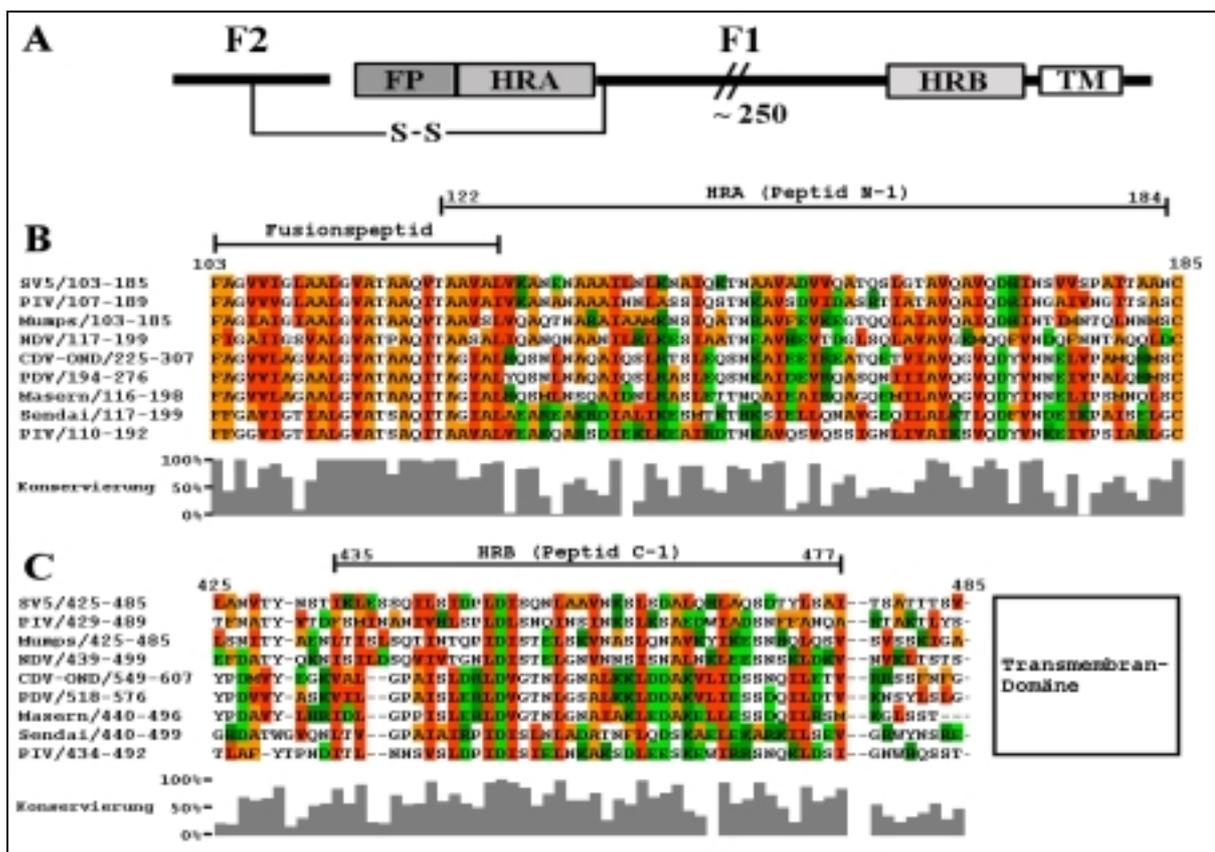


Abb. 5.1: Schematische Struktur des CDV-F-Proteins und Sequenzvergleich der HR-Domänen verschiedener Paramyxoviridae. A) Das dargestellte Schema zeigt das nach proteolytischer Spaltung des Vorläufer-Proteins F₀ aus F₁ und F₂ bestehende Fusions-Protein von CDV. FP und TM beziehen sich auf das Fusionspeptid, bzw. die Transmembrandomäne. HRA und HRB bezeichnen die in (B) und (C) markierten Regionen mit den Heptad-Wiederholungen. F₁ und F₂ sind über eine Disulfidbrücke zwischen den Cysteinen an Position 180 und 307 verbunden. B, C) Sequenzvergleich des Fusionspeptids und der beiden HR-Domänen des SV5 F-Proteins mit dem anderer Paramyxoviridae. Die Viren sind absteigend nach ihrem Verwandtschaftsgrad mit SV5 angeordnet. Der Grad der Konservierung einzelner Aminosäuren ist an der grauen Skala unterhalb der Sequenzen abzulesen. Hydrophobe AS sind abhängig von ihrer Hydrophobizität dunkel bis hell orange hinterlegt, positiv oder negativ geladenen AS sind dunkelgrün bzw. hellgrün umrandet.

Kürzlich wurde mit synthetischen Peptiden, deren Aminosäuresequenz identisch mit HRA und HRB ist, die strukturelle Basis der Paramyxoviridae-induzierten Membranfusion untersucht und u.a. mittels Röntgen-Kristallographie die dreidimensionale Struktur des von den HR-Peptiden gebildeten Kern-Trimers des SV5-Fusionsproteins ermittelt (Baker et al., 1999):

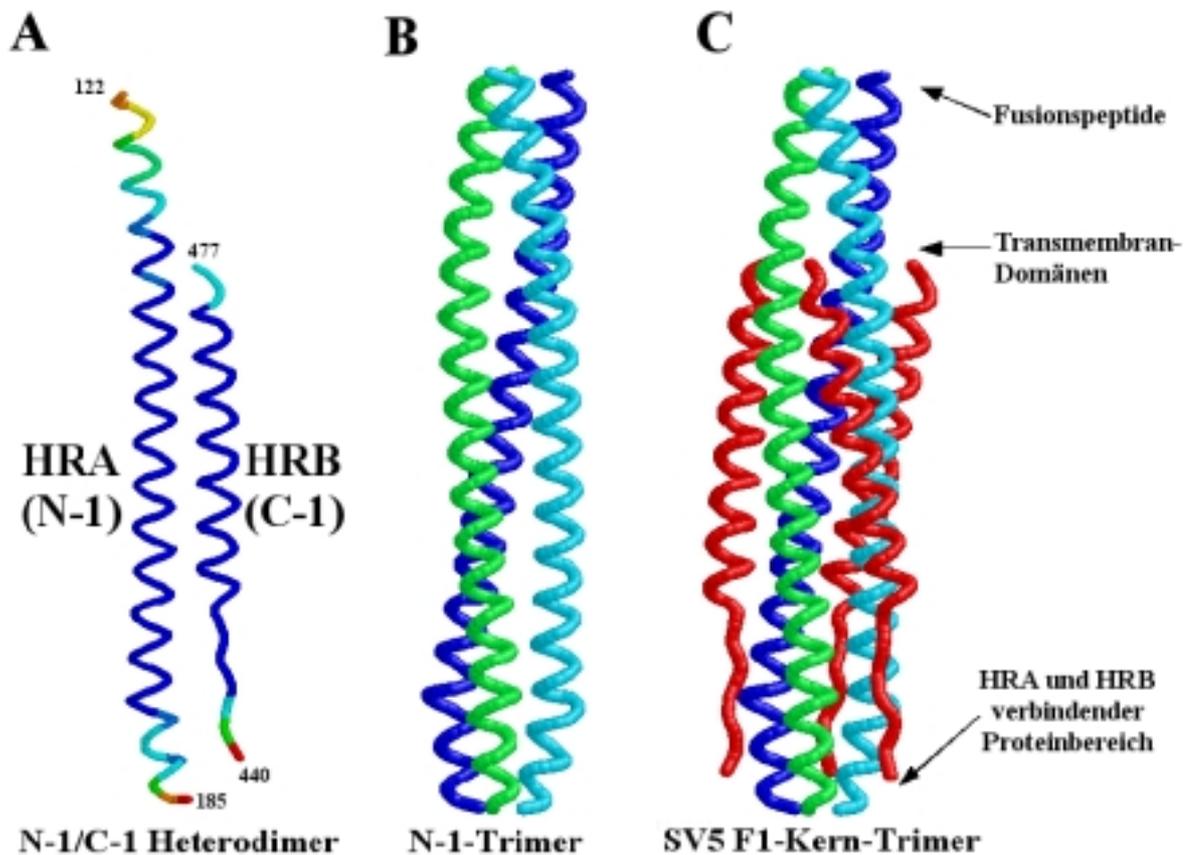


Abb. 5.2: Dreidimensionale Struktur des SV5 F1-Kern-Trimers. A) Darstellung eines N-1/C-1 Heterodimers. Die Färbung der Struktur gibt den Ordnungsgrad des Dimers im Kristall wieder, wobei der Bereich von blau (=hohe Ordnung) bis rot (=Bereich großer Unordnung) reicht. B) Drei α -helikal ineinander gewundenen N-1-Peptide („Coiled coil“) bilden den Kern eines F-Trimers. C) Das komplette SV5 F1-Kern-Trimer besteht aus dem inneren, α -helikalen N-1-Trimer um das sich in antiparalleler Orientierung drei C-1-Peptide (rot) wickeln. Die Pfeile zeigen die Lage der Fusionspeptide und Transmembran-Domänen auf.

Peptid N-1 entspricht HRA und Peptid C-1 ist homolog zu HRB. Wie in Abbildung 5.2 dargestellt bilden N-1 und C-1 Heterodimere, wobei wiederum drei Dimere ein Trimer bilden. Dabei bilden die N-1-Peptide eine dreisträngige α -helikale Quartärstruktur (coiled-coil) aus, die den Kern des F-Trimers bildet. Um diese N-1-Kern-Struktur wickeln sich ebenfalls helikal, aber in antiparalleler Orientierung, drei C-1-Peptide (Abb. 5.2 C). Diese helikale Quartärstruktur des F₁-Trimers gibt höchstwahrscheinlich nicht die Struktur des fusogenen F wieder, sondern stellt die finale, stabilste Struktur dar, die ein F-Trimer nach mehreren Konformationsänderungen am Ende des Fusionsprozesses aufweist. Dafür spricht Erstens, dass dieser Komplex sehr thermostabil (> 90°C) und relativ unempfindlich gegenüber SDS oder Proteasen ist (Joshi et al., 1998; Dutch et al., 1999). Zum Zweiten liegen in dieser Konformation das Fusionspeptid und die Transmembrandomäne nahe beieinander auf der

selben Seite der helikalen Kernstruktur des F-Proteins (Abb. 5.2 C). Drittens blockieren N-1-Peptide im Rahmen der SV5-induzierten Zell-Zell-Fusion die Mischung des Cytosols, nicht aber die Hemifusion. C-1-Peptide dagegen blockieren sowohl die Hemifusion als auch die Synzytienbildung (Joshi et al., 1998).

Eine trimere, helikale Kern-Struktur des Fusionsproteins und eine Blockierung der viral-induzierten Zellfusion durch den HR-Domänen entsprechende Peptide wurde auch für NDV und das Respiratorische Syncytialvirus (RSV) beschrieben (Matthews et al., 2000, Young et al., 1999). Die für das SV5 ermittelte Struktur des Fusionsproteins scheint also im wesentlichen für die gesamte Familie der Paramyxoviridae zu gelten. Für Paramyxoviridae kann folgendes Modell der viral-induzierten Fusionsmechanismen aufgestellt werden:

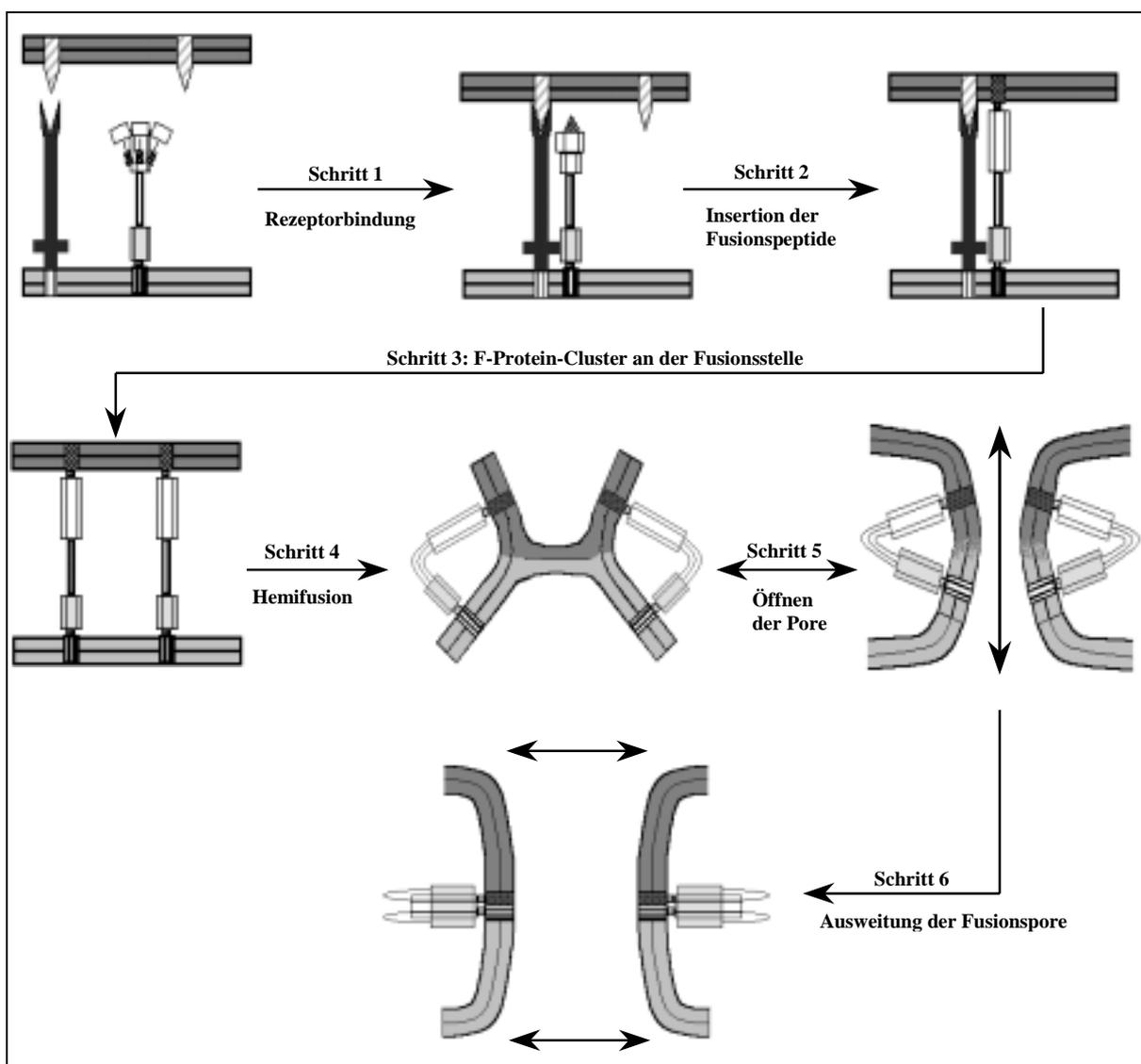


Abb. 5.3: Modell der virus-induzierten Zell-Zell-Fusion bei den Paramyxoviridae. Die Membran der infizierten Zelle ist hellgrau gezeichnet, während die Membran der uninfizierten Zielzelle dunkelgrau gefärbt ist. Aus Gründen der Übersichtlichkeit wird ab Schritt 3 auf die Darstellung der H bzw. HN-Proteine (dunkelgraues Membranprotein) und deren Rezeptoren (grau schraffierte Keile) verzichtet. Die Details des Fusionsprozesses sind im folgenden Text beschrieben.

Schritt 1: Rezeptorbindung und Konformationsänderungen. Durch die Bindung des HN, bzw. H an seinen Rezeptor werden die Membranen der infizierten und der uninfizierten Zelle auf einen präzisen Abstand zueinander gebracht. Die Wichtigkeit der korrekten Länge des Membran-Abstandes, vor allem für die Zell-Zell-Fusion, wurde am Masernvirus gezeigt: Veränderungen der Länge des Rezeptors CD46 hatten negative Auswirkung auf die Zell-Zellfusion (Buchholz et al., 1996). Gleichzeitig kommt es infolge der Rezeptorbindung zu Interaktionen bzw. Assoziation zwischen H und F, wodurch F zur Bindungsstelle rekrutiert wird. Die Assoziation von H und F bewirkt Konformationsänderung(en) im Fusions-Protein, wodurch die Insertion des Fusionspeptids in die Membran-Doppelschicht vorbereitet wird.

Schritt 2: Bindung der Zielmembran durch das F-Protein. Es spricht einiges dafür, dass bis zur Fusion die hydrophoben Fusionspeptide im Inneren des F-Trimers verborgen sind, um ihre Aggregation in wässriger Umgebung zu verhindern (Baker et al., 1999). Die H/F-Interaktion führt zu einer Umfaltung der Fusionspeptide bzw. des F-Trimers, die dann in die Membran der Zielzelle inserieren und diese binden. Eventuell geht die Membranbindung aber auch mit einer Bindung des Fusions-Proteins an einen Fusionsrezeptor oder Korezeptor einher, wodurch die stammpezifischen Unterschiede in der Synzytienbildung mancher Viren erklärt werden könnten.

Schritt 3: Ansammlung von F-Trimeren an der Fusionsstelle. Es wird vermutet, dass sich in diesem der Verschmelzung der beiden Zellmembranen vorausgehenden Schritt mindestens drei oder vier F-Trimere an der Fusionsstelle ansammeln, eine bestimmte Orientierung zueinander einnehmen und in die Zielmembran inserieren. Für das Sendai Virus wurde gezeigt, dass HN und F unabhängig voneinander in der Membran diffundieren (Katzir et al., 1989). Eine Immobilisierung von HN oder F beeinflusst die Virus-Zell-Fusion kaum, führt aber zu einer starken Hemmung der Zell-Zell-Fusion, deren Stärke abhängig vom Grad der lateralen Mobilität der Glykoproteine ist (Henis et al., 1989). Es wird vermutet, dass dabei das an den Rezeptor gebundene H-Tetramer als Grundgerüst für die korrekte Anordnung der F-Trimere dient. Für das Fusionsglykoprotein des Influenza-Virus wurde gezeigt, dass während dieses Schrittes die F-Trimere kooperativ Änderungen in der Art der Interaktion zwischen ihren Fusionspeptiden und der Membran durchlaufen (Gething et al., 1986, Guy et al., 1992, Steinhauer et al., 1995, Gray et al., 1996). Zudem sind Änderungen der rotationalen und lateralen Beweglichkeit der Trimere festzustellen (Junankar & Cherry 1986, Gutman et al 1993).

Schritt 4: Konformationsänderungen und Hemifusion. Die F-Proteine bleiben nun fest mit der Zielmembran und der Membran der infizierten Zelle über die Fusionspeptide und die Transmembran-Domänen verbunden. Wenn sich nun mehrere F-Trimere radial nach außen, weg von der Fusionsstelle biegen, würden die beiden Membran-Doppelschichten gezwungen

sich ebenfalls mitzubiegen. Eine solche konzertierte Biegungsaktion würde die beiden Membranen dann in den Zwischenzustand der Hemifusion überführen. Für die Paramyxoviridae lassen biochemische und strukturelle Daten den Schluss zu, dass für diesen Schritt der Fusion keine flexiblen Proteinbereiche zwischen den HR-Domänen und dem Fusionspeptid und der Transmembrandomäne benötigt werden. Vielmehr wird dieser Fusionsprozess durch Konformationsänderungen des ca. 250 Aminosäuren langen Proteinbereichs zwischen HRA und HRB vorangetrieben (Baker et al., 1999).

Schritt 5: Öffnung der Fusionspore. Es wird vermutet, dass das F, evtl. aufgrund weiterer Konformationsänderungen, eine steigende Spannung im Hemifusions-Diaphragma aufbaut, welche dann zum Reißen des Diaphragmas führt. Bei Influenza wurde ein „Flackern“ der neuen Fusionsporen beobachtet, was auf eine gewisse Reversibilität von Schritt 5 schließen lässt (Spruce et al., 1989, 1991, Melikyan et al., 1993).

Schritt 6: Ausweitung der Fusionspore. Es ist nicht mit Sicherheit zu sagen, was die irreversible Öffnung und Ausweitung der Fusionspore vorantreibt. Aufgrund der Strukturdaten des F von SV5, NDV und RSV kann für die Paramyxoviridae angenommen werden, dass der finale Schritt der Fusion durch Konvertierung des F in die bereits beschriebene finale, thermodynamisch günstigste „Coiled-coil“-Form angetrieben wird. Dabei würde die aufgrund der thermodynamischen Enthalpieänderung frei werdende Energie die finale Konformationsänderung direkt mit der Fusion der beiden Membranen koppeln. Nach Abschluss der Fusion befinden sich das Fusionspeptid und die Transmembran-Domäne in derselben fusionierten Membran. Es wurde beobachtet, dass durch eine Fusionspore zuerst nur kleine Moleküle wandern und erst im Laufe der Zeit auch größere Moleküle (Zimmerberg et al., 1994). Die Gründe hierfür könnten eine Verschmelzung mehrerer Poren miteinander oder eine aktive Ausweitung der Fusionspore sein, an der wahrscheinlich andere Membranmoleküle und das Cytoskelett beteiligt sind. Durch fortschreitende Ausweitung bestehender Fusionsporen kommt es dann zur Verschmelzung zweier Zellen und somit zur Bildung von Synzytien.

5.4 Welche Rolle spielt CD9 bei Zell-Zell-Fusionsvorgängen?

Es stellt sich die Frage, wie CD9 in dieses Modell der viralen Fusionsprozesse eingebaut werden muss, um erklären zu können, wie CD9-Antikörper zwar die Zell-Zell-Fusion hemmen, ohne aber ebenfalls die Virus-Zell-Fusion zu beeinträchtigen. Vieles deutet darauf hin, dass hinsichtlich der Fusionsvorgänge deutliche Unterschiede zwischen der Virus-Zell-Fusion und der viral induzierten Zell-Zell-Fusion bestehen.

5.4.1 Die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion unterscheidet sich von der Virus-Zell-Fusion

Für Virus-Zell und Zell-Zell-Fusion ergeben sich mechanistische Unterschiede schon daraus, dass sich für eine Fusion die beiden Membran-Doppelschichten mindestens bis auf 1,5 nm aneinander annähern müssen (Alberts, 1994). So können z.B. stark glykosylierte Membranproteine aufgrund sterischer Hinderungen die Annäherung zweier Zellmembranen hemmen. Die Annäherung von Virushülle und Zellmembran dürfte dagegen aufgrund der geringen Größe und der größeren Flexibilität des Viruspartikels deutlich leichter ablaufen und somit relativ unbeeinflusst von sterischen Hinderungen durch zelluläre Oberflächenproteine sein.

Die Voraussetzungen für eine Zell-Zell-Fusion, i.e. die Synzytienbildung, scheinen viel stringenter zu sein und anders reguliert zu werden als die Virus-Zell-Fusion. Das zeigt schon der Umstand, dass umhüllte Viren mit der Wirtszellmembran fusionieren, um eine Infektion zu bewirken, während unter gleichen Bedingungen aber nicht alle Viren trotz erfolgreicher Infektion auch eine Synzytienbildung induzieren, wie z.B. die CDV-Stämme Rockburn und Dog/N1. Gerade die Zell-zu-Zell-Ausbreitung ohne Zell-Zell-Fusion von Morbilliviren *in vivo* oder *in vitro* zeigt, dass es zu „Mikrofusionen“ zwischen zwei Zellen kommen kann, die zwar die Weitergabe infektiösen Materials erlauben, aber nicht zwangsläufig auch sofort zur Synzytienbildung führen (Firsching et al., 1999, Duprex et al., 1999, Zurbriggen et al., 1995). Dies deutet darauf hin, dass im Falle der Zell-Zell-Fusion die Porenbildung und/oder die Porengröße reguliert wird.

Die Fähigkeit, eine Zellfusion und die Bildung von Synzytien zu verursachen, ist zum einen abhängig von viralen Faktoren, wie der Sequenz der viralen Fusionsproteine aber auch der Sequenz anderer Virusproteine. Auch die Dichte der viralen Fusionsproteine in der Membran spielt eine wichtige Rolle (Gething et al., 1986, Dutch et al., 1998). Gegenüber der Verteilung zellulärer Membranproteine in der Zellmembran ist die Dichte viraler Glykoproteine in der Hüllmembran von Viruspartikeln sehr hoch, und während der Knospung werden zelluläre Membranproteine ausgeschlossen.

Zum anderen wird die viral induzierte Zell-Zell-Fusion von zellulären Oberflächenproteinen beeinflusst und reguliert. Leider ist über die genauen Funktionsmechanismen solcher zellulären, fusionsregulierenden Moleküle noch wenig bekannt. Neben dem CD9, das wie in dieser Dissertation beschrieben Einfluß auf die CDV und NDV-induzierte Zell-Zell-Fusion hat, sind in der Literatur nur wenige andere fusionsregulierenden Proteine beschrieben. Man weiß zum einen, dass die Synzytienbildung bei HTLV-1 (Human T cell Leukemia Virus) zelltypspezifisch durch ICAM-1, ICAM-3 and VCAM-1 reguliert wird und durch Antikörper gegen die Integrine β_2 oder β_7 gehemmt wird (Daenke et al., 1999). Andererseits gibt es noch die vor ein paar Jahren entdeckten fusionsregulierenden Proteine FRP-1 und FRP-2. Entdeckt wurden diese Proteine mit Hilfe von gegen sie gerichtete monoklonalen Antikörpern, welche die NDV-induzierte Zell-Zell-Fusion stimulieren (Ito et al., 1987, 1992). Bei FRP-1 handelt es sich um die schwere Kette von CD98 und FRP-2 wurde als α_3 -Untereinheit von Intergrinen

identifiziert (Oghimoto et al., 1995; Ohta et al., 1994). Ähnlich wie CD9 scheint FRP-1/CD98 ebenfalls eine Vielzahl von Funktionen zu haben, die vom Aminosäuren-Transport (Wells et al., 1992) über $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ Austausch (Michalak et al., 1986) bis zur Rolle als Zell-Wachstumsfaktor reichen (Spagnoll et al., 1991, Freidmann et al., 1994). Interessanterweise stimulieren Antikörper gegen FRP-1 die NDV-induzierte Zell-Zell-Fusion, hemmen aber andererseits die Parainfluenza Virus Typ 2-induzierte Zellfusion (Okamoto et al., 1997). Dabei können sich verschiedene monoklonale Antikörper gegen FRP-1 auch gegenseitig in ihrer Wirkung aufheben. Dies zeigt, dass das CD98-System sozusagen multifunktional die Zellfusion aktivieren oder inhibieren kann. Hier zeigen sich ebenfalls Parallelen zu CD9, da CD9-Antikörper im Fall von CDV die Zellfusion hemmen, bei NDV aber eine Verstärkung der Fusion bewirken. Bei Untersuchungen zur Regulation der HIV-induzierten Zell-Zell-Fusion durch FRP-1 und FRP-2 stellte sich heraus, dass es sich dabei um zwei unterschiedliche Regulationssysteme handelt, diese aber untereinander über „Cross-Talk“ verbunden zu sein scheinen (Oghimoto et al., 1996). Anhand der HIV-induzierten Zellfusion konnte auch gezeigt werden, dass die Wirkung von FRP-1-Antikörpern u.a. auf der Regulation der Aktivierung von Integrinen und Tyrosin-Kinasen beruht (Ohta et al., 1994, Tabata et al., 1998). Die Integrinaktivierung ist vermutlich auf die Assoziation der cytoplasmatischen Domänen von CD98/FRP-1 und Integrinen zurückzuführen, während die Kinase-Aktivierung über die Auslösung intrazellulärer Signale zustande kommt (Deves und Boyd, 2000). Auch hierin zeigen sich wieder frappierende Ähnlichkeiten zu CD9. Für CD9 ist ebenfalls eine Assoziation mit Integrinen, im besonderen β_1 -Integrine, beschrieben, die Adhäsionsvorgänge und Zellwanderungsprozesse steuert (Masellis-Smith et al., 1994, Berditchevski und Odintsova, 1999). Desweiteren ist auch CD9 an der Auslösung von Signalwegen und der Aktivierung von Tyrosin-Kinasen beteiligt (Yatomi et al., 1990, 1993, Berditchevski und Odintsova, 1999).

5.4.2 CD9 ist auch an der Regulation nicht viral induzierter Zellfusionen beteiligt

Kürzlich wurde gezeigt, dass FRP-1 und CD9 aber nicht nur an viral-induzierten Fusionsprozessen beteiligt sind, sondern auch an Zell-Zell-Fusion im Zuge der Entwicklung. Sowohl FRP-1/CD98 als auch CD9 modulieren die Fusion von Blut-Monocyten, dem ersten Schritt der Genese von Osteoklasten, vermutlich über die Aktivierung von Tyrosin-Kinasen (Tajima et al., 1999, Tanio et al., 1999). CD9 ist auch an der Myogenese beteiligt: Die Bildung von CD9- β_1 -Integrinkomplexen wird in Koordination mit der Differenzierung von Myoblastzellen reguliert. Ektopische Expression von CD9 verursacht einen Anstieg der Fusion von Myoblasten um das 4 bis 8-fache, während CD9- und CD81-Antikörper diese Synzytienbildung deutlich verlangsamen. Die beiden Tetraspanine CD9 und CD81 fördern also die Fusion von Muskelzellen und unterstützen daneben die Aufrechterhaltung von Myotuben (Tachibana und Hemler, 1999). Desweiteren spielt CD9 auch eine wichtige Rolle bei der Fusion von

Gameten. Chen et al. (1999) konnten als erste zeigen, dass CD9-Antikörper die Bindung von Spermien an Eizellen und die anschließende Fusion der beiden Keimzellen verhindern. Die Beteiligung von CD9 an der Spermium-Eizelle-Fusion konnte an CD9-Knockout-Mäusen bestätigt werden. Weibliche CD9-defiziente Mäuse haben trotz der normalerweise breiten Verteilung von CD9 in verschiedensten Geweben einen normalen Phenotyp, weisen aber eine stark verminderte Fruchtbarkeit auf. Die Eizellen dieser Knockout-Mäuse binden zwar in normaler Art und Weise Spermien, ihre Fähigkeit mit diesen zu fusionieren ist aber nahezu vollständig gehemmt (Kaji et al., 2000; Le Naour et al., 2000; Miyado et al., 2000, Miller et al., 2000). CD9 ist also essentiell für die Fusion von Spermien und Eizellen. Die Frage, ob die Wirkung von CD9 allein auf sich selbst beruht oder auf einer Interaktion mit Eizellproteinen, vornehmlich dem $\alpha_6\beta_1$ -Integrin, wird zur Zeit noch kontrovers diskutiert (Chen et al., 1999, Miller et al., 2000).

Zusammengefaßt zeichnet sich ab, dass CD9 wohl nicht als Rezeptor oder Korezeptor angesehen werden muss, sondern eher als Fusionsvermittler, der die Funktion anderer Oberflächenmoleküle beim Fusionsprozess sicherstellt bzw. steuert. FRP-1 und CD9 nehmen wahrscheinlich über ähnliche Mechanismen Einfluß auf Zellfusionsprozesse. Sehr vieles spricht dabei dafür, dass einer dieser Regulationmechanismen auf der Interaktion von FRP-1 oder CD9 mit Integrinen beruht. Als weiterer Regulationsmechanismus wurde auch die Auslösung von intrazellulären Signalen identifiziert. Im Falle einer viral-induzierten Zellfusion scheint bei gleichzeitiger Expression von FRP-1 und CD9 die Involvierung beider Systeme in die Fusionsvorgänge abhängig vom jeweiligen Virus-Zell-System zu sein. Während bei einer Infektion von Vero- oder HeLa-Zellen mit NDV Antikörper gegen beide Proteine die Fusion fördern, hemmen bei einer Infektion mit CDV nur CD9-Antikörper die Fusion, während FRP-1-Antikörper keine Wirkung zeigen (siehe 4.9.1.2). Dagegen haben FRP-1-Antikörper Einfluß auf die HIV-vermittelte Zellfusion, wogegen hier mit CD9-Antikörpern keine Wirkung erzielt werden kann.

Die genaue Art der Fusionsregulierung im Fall der viral-induzierten Zell-Zell-Fusion scheint ebenfalls vom verwendeten Virus abhängig zu sein. So legen z.B. die unterschiedlichen Mengen an K41, die für die Fusionshemmung bei CDV ($>12 \mu\text{g/ml}$) und die Fusionsstimulierung bei NDV ($0, 1 \mu\text{g/ml}$) benötigt werden, den Schluss nahe, dass hier zwei verschiedenen Regulationsmechanismen zum Zuge kommen. Die relativ hohe Konzentration, welche für die Fusionshemmung bei CDV gebraucht wird könnte ein Zeichen dafür sein, dass hier CD9 über Interaktionen und Assoziationen zellulärer Oberflächenproteinen an der Zell-Zell-Fusion beteiligt ist. Durch die Bindung der Antikörper an CD9 werden diese Interaktionen gestört oder blockiert, was zur Hemmung der Fusion führt. Aufgrund der relativ starken Expression von CD9 ist eine hohe Konzentration von Antikörpern nötig, um die fusionsrelevanten Interaktionen oder Assoziationen zu blockieren. Die deutlich geringere Menge an CD9-Antikörpern, die eine Stimulierung der NDV-induzierten Zellfusion bewirkt, könnte ein Hinweis

darauf sein, dass hier CD9 über die Auslösung von Signalwegen wie z.B. einer Aktivierung von Tyrosinkinasen in die Fusionsprozesse eingreift.

5.4.3 Hypothesen zur Funktion von CD9 bei der CDV-induzierten Zell-Zell-Fusion

Mit diesem Hintergrund können über die Art und Weise, wie CD9 die CDV-induzierte Synzytienbildung direkt oder indirekt beeinflusst, verschiedene Hypothesen aufgestellt werden. Fusionsassays mit persistent CDV-infizierten und uninfizierten HeLa-Zellen legen dabei den Schluss nahe, dass CD9 über mehr als nur einen einzigen Mechanismus auf die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion wirkt (vgl. 4.5.1.3): Im Fusionsassay führt eine alleinige Behandlung der uninfizierten Zellen mit CD9-Antikörpern vor der Mischung mit unbehandelten, infizierten Zellen zu einer Hemmung der darauffolgenden Synzytienbildung um ca. 51%. Die alleinige Vorbehandlung der persistent infizierten HeLa-Zellen führte aber ebenfalls zu einer Reduzierung der Zell-Zell-Fusion um 44%. Werden beide Zellpopulationen mit mAK K41 vorbehandelt ist die Synzytienbildung nach Mischung beider Zellpopulationen um 69% reduziert. Man kann daraus, dass die Hemmeffekte nicht vollständig additiv sind, ableiten, dass der Effekt des CD9-Antikörpers auf uninfizierte und persistent infizierte Zellen wahrscheinlich nicht auf zwei vollkommen unterschiedlichen Mechanismen beruht. Zum einen bewirken die CD9-Antikörper einen fusionhemmenden Effekt auf der Seite der uninfizierten Zellen, d.h. CD9 muss zelluläre Moleküle beeinflussen, die an der Zell-Zell-Fusion beteiligt sind. Da aber die Virusbindung durch CD9-Antikörper nicht gehemmt wird, muss es sich hierbei um Moleküle handeln, die wahrscheinlich nicht als Virusrezeptor dienen sondern nur die Fusion beeinflussen. Andererseits erzielt mAK K41 aber auch einen hemmenden Effekt auf Seite der persistent infizierten Zellen, wo auch er Einfluß auf die Aktivität der viralen Hüllproteine nehmen könnte.

Hypothetisch könnte die von CD9-Antikörpern verursachte Fusionshemmung und die durch Transfektion von CD9 verbesserte Infizierbarkeit von Zellen (Löffler et al., 1997) zum Teil daran liegen, dass CD9 direkt mit beiden oder nur einem der viralen Glykoproteine interagiert und ihre Funktion beeinflussen kann. Diese direkte Interaktion könnte membrandistal erfolgen, d.h. CD9 auf der Membran der Zielzelle interagiert mit H oder F auf der Membran der „angreifenden“ Zelle. Dagegen spricht jedoch, dass, wie in 5.1 beschrieben, mit CD9-Antikörpern weder die Virusbindung noch die Virusaufnahme positiv oder negativ beeinflusst werden kann. Wenn nun aber für die hypothetische Interaktion von CD9 mit H oder F beide Proteine in der selben Membran vorliegen müssen, gilt dieses Argument nicht mehr, da sich auf der Virushülle nur die viralen Glykoproteine F und H befinden. CD9-Antikörper könnten somit die Virusbindung oder Aufnahme nicht beeinflussen, da CD9, H und F nur in der Membran infizierter Zellen gemeinsam vorkommen. Dieses Argument wird aber durch Immunopräzipitationsversuche und VOPBA's mit CDV-infizierten Zellen entkräftet, die keine Anzeichen für eine direkten Interaktion von CD9 mit CDV-Glykoproteinen in der Membran infizierter Zellen ergaben (Löffler et al., 1997). Eine direkte Interaktion ist aber

damit nicht vollständig ausgeschlossen, da eine Assoziation mit sehr niedriger Affinität mit diesen Methoden eventuell nicht nachweisbar ist.

CD9 könnte die viralen Glykoproteine aber auch indirekt in ihrer Funktion regulieren, d.h. über Signaltransduktion (z.B. über Regulation einer Kinaseaktivität). In diesem Fall wäre dann die direkte Assoziation von CD9 mit viralen Proteinen nicht notwendig. Diese Signale könnten die Fusionsprozesse z.B. dadurch steuern, dass sie die Phosphorylierung fusionsrelevanter Proteine aktivieren oder die Interaktionen zwischen den an der Fusion beteiligten Molekülen verändern. Bei der CDV-induzierten Zellfusion spricht zwar die hohe Konzentration an CD9-Antikörpern, die zur Hemmung benötigt wird, nicht dafür, dass diese Hemmung hauptsächlich über intrazelluläre Signale vermittelt wird. Aber es kann nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Bindung der CD9-Antikörper ausgelöste Signale einen gewissen Anteil an der Fusionshemmung haben. Dagegen scheint die Verstärkung der NDV-induzierten Zellfusion durch CD9-Antikörper im wesentlichen auf solch einem über CD9 aktivierten Signalweg zu beruhen.

Es wäre auch ein anderer Interaktionsmechanismus zwischen CD9 und dem CDV-Rezeptor denkbar, bei dem nicht direkt die Rezeptorbindung beeinflusst wird: Wie bereits geschildert, ist die korrekte Bindung von H-Proteinen an die Rezeptoren für Zellfusionsvorgänge sehr wichtig, da wahrscheinlich hierbei die Zellmembranen auf den richtigen Abstand zueinander gebracht werden (Fusionsmodell Schritt 1). Durch die Interaktion von Rezeptoren und anderen Membranproteinen (z.B. Korezeptoren) mit CD9 könnten Konformationsänderungen oder Änderung in der Assoziation der Proteine untereinander bewirkt werden. Aufgrund dieser Änderungen könnte sich die Länge des Rezeptors oder Rezeptorkomplexes so verändern, dass bei Bindung durch das H-Protein die Zellmembranen auf einen für die Fusion, bzw. das Fusionsprotein optimalen Abstand gebracht werden. Dies könnte als zweite Möglichkeit auch nach erfolgter Rezeptorbindung stattfinden, wenn CD9 über eine Interaktion mit dem neu gebildeten H-Rezeptorkomplex in diesem fusionsoptimierende Konformationsänderungen bewirken würde. Ein solcher Wirkungsmechanismus würde die Beobachtung erklären, dass CD9-Antikörper nur einen Effekt auf die Zell-Zell-Fusion haben, nicht aber auf die Virusbindung, da diese in diesem Fall ja an sich nicht beeinträchtigt wird. So wäre auch erklärbar, wieso selbst mit hohen Konzentrationen an CD9-Antikörpern nur eine starke Verzögerung, aber keine Blockierung der Synzytienbildung erreicht werden kann: Durch die Bindung von mAK K41 an CD9 könnte die Einstellung eines für die Fusion optimalen Membranabstandes zwischen infizierten und uninfizierten Zellen verhindert werden. Die Anheftung und die Funktion des F-Proteins wird dabei nicht beeinträchtigt, aber die Anzahl der stattfindenden Fusionsereignisse wird stark reduziert. Es wäre zudem auch möglich, dass bei einem nicht korrekten Membranabstand die Kinetik der Fusionsprozesse verlangsamt wird. Dass kein Effekt von CD9-Antikörpern auf die Virusaufnahme zu beobachten ist, könnte daran liegen, dass für eine Virus-Zell-Fusion aufgrund der geringen Größe, der Flexibilität und des hohen H/F-Gehalts der Virushülle die exakte Einstellung des Abstandes

zur Zellmembran deutlich einfacher sein dürfte und deshalb CD9 nicht zur „Fusionsoptimierung“ benötigt wird.

Einige Oberflächenmoleküle wie Integrine und Catherine sind auch mit dem Cytoskelett verbunden und können direkt Einfluß auf die Organisation des Cytoskeletts nehmen. CD9 könnte also auch durch Interaktion mit cytoskelett-assoziierten Membranproteinen oder über die Auslösung intrazellulärer Signalwege das Cytoskelett beeinflussen. Es ist noch nicht bekannt ob und auf welche Weise Strukturen des Cytoskeletts am Prozess der Zell-Zell-Fusion beteiligt sind. Es wäre aber vorstellbar, dass es z.B. an Prozessen wie einer aktiven Ausweitung von Fusionsporen und der Synzytienbildung beteiligt ist.

Neben der Zell-Zell-Fusion ist auch die Virusfreisetzung (vgl. 5.3) teilweise gehemmt. Diese Hemmung könnte auf vergleichbaren Mechanismen beruhen wie die Hemmung der Zell-Zell-Fusion. CD9-Antikörper könnten über die Auslösung von Signalwegen oder über Effekte auf zelluläre Moleküle, wie z.B. das Cytoskelett, den Transport der viralen Proteine zur Zellmembran hemmen. Es wäre aber auch möglich, dass darüber die für das Virus-Assembly wichtigen Interaktionen zwischen dem viralen M-Protein und den Glykoproteinen F und H einerseits, und der Interaktion von M und RNP-Komplex andererseits gestört werden. Als weitere Möglichkeit bleibt noch, dass der Vorgang der Virusknospung gestört wird. Gerade dabei wäre denkbar, dass CD9-Antikörper eine Veränderung der Zellmembran bewirken: Wenn CD9 mit zellulären Membranproteinen interagiert, könnte durch mAK K41 diese Interaktion gestört und somit die Membranfluidität verändert werden. Dies könnte den Knospungsprozess auch dahin gehend beeinflussen, dass die notwendige Verdrängung von zellulären Membranproteinen durch die viralen Glykoproteine am Ort einer Virusknospung verhindert wird.

5.5 Die CDV-Laborstämme unterscheiden sich in ihren zytopathischen Effekten- Ursachen für die Unterschiede zwischen SI- und NSI-CDV-Stämmen

Die im Rahmen dieser Dissertation verwendeten CDV-Laborstämme zeigen zwar alle den nahezu gleichen Bindungstropismus, unterscheiden sich aber untereinander in ihren zytopathischen Effekten. Man kann sie deshalb in zwei Gruppen, die Synzytien-induzierenden (SI) und nicht Synzytien-induzierenden Stämme (NSI) einteilen. Während die Onderstepoort-Abkömmlinge OND-LP, OND-SP und Bussel, sowie der Vero-adaptierte Stamm A75/17-V in meisten infizierbaren Zelltypen die Bildung großer Synzytien verursachen, kommt es in mit den Stämmen Rockburn, Dog/NI und HAN2245/95 infizierten Zellkulturen nicht zur Zell-Zell-Fusion. OND-LP, OND-SP und Bussel sind verschiedene Klone des Onderstepoort-Stammes, welcher auf das Isolat eines natürlich aufgetretenen Distemper-Falls zurückgeht, das zunächst in Frettchen und dann in Hühnereiern weiterpassagiert wurde. Nach der Passagierung in Hühnereiern wurde das nun apathogene Virus als CDV-Onderstepoort

bezeichnet und im Labor vorwiegend in Vero-Zellen weiterkultiviert (Haig, 1948). Die Sequenz der drei Stämme OND-LP, OND-SP und Bussel ist somit nahezu identisch. Der vierte SI-Stamm A75/17-V wurde durch 17 Passagen des virulenten A75/17-CDV-Stammes, ausgehend von infiziertem lymphoiden Gewebe, auf Vero-Zellen adaptiert (Hamburger et al., 1991). Der NSI-Stamm Rockburn wurde ursprünglich ebenfalls aus einem Distemper-Fall isoliert, wurde aber im Gegensatz zu Onderstepoort durch zahlreiche wiederholte Passagen in Hundenieren-Zellen (MDCK) attenuiert (Rockburn, 1958). Im Gegensatz zu den Onderstepoort-Stämmen zeigt Rockburn noch eine gewisse „Restvirulenz“ und revertiert nach wenigen Passagierungen in primären Hundemakrophagen wieder zur vollständigen Virulenz (Appel, 1978). Dog/NI und HAN2245/95 sind neuere Isolate aus an Distemper erkrankten Hunden die an Vero-Zellen adaptiert wurden, wobei HAN2245/95 mit 6-8 Passagen eventuell noch nicht vollständig an Vero-Kulturen angepasst ist. Bei den NSI-Stämmen scheint sich die Infektion in der Zellkultur im wesentlichen über die Knospung neuer Viruspartikel auszubreiten, was auch den langsameren Infektionsverlauf der NSI-Stämme erklären würde. Zudem zeigt sich bei den NSI-Stämmen auch keine Beeinflussbarkeit der Infektion durch CD9-Antikörper, während die Antikörper bei allen SI-Stämmen die Zell-Zell-Fusion hemmen. Es stellt sich die Frage, wieso manche Stämme bei erfolgreicher Infektion keine Synzytienbildung induzieren, obwohl infektiöses Virus produziert wird und in infizierten Zellen somit die viralen Glykoproteine H und F auch in der korrekt funktionierenden Form exprimiert werden.

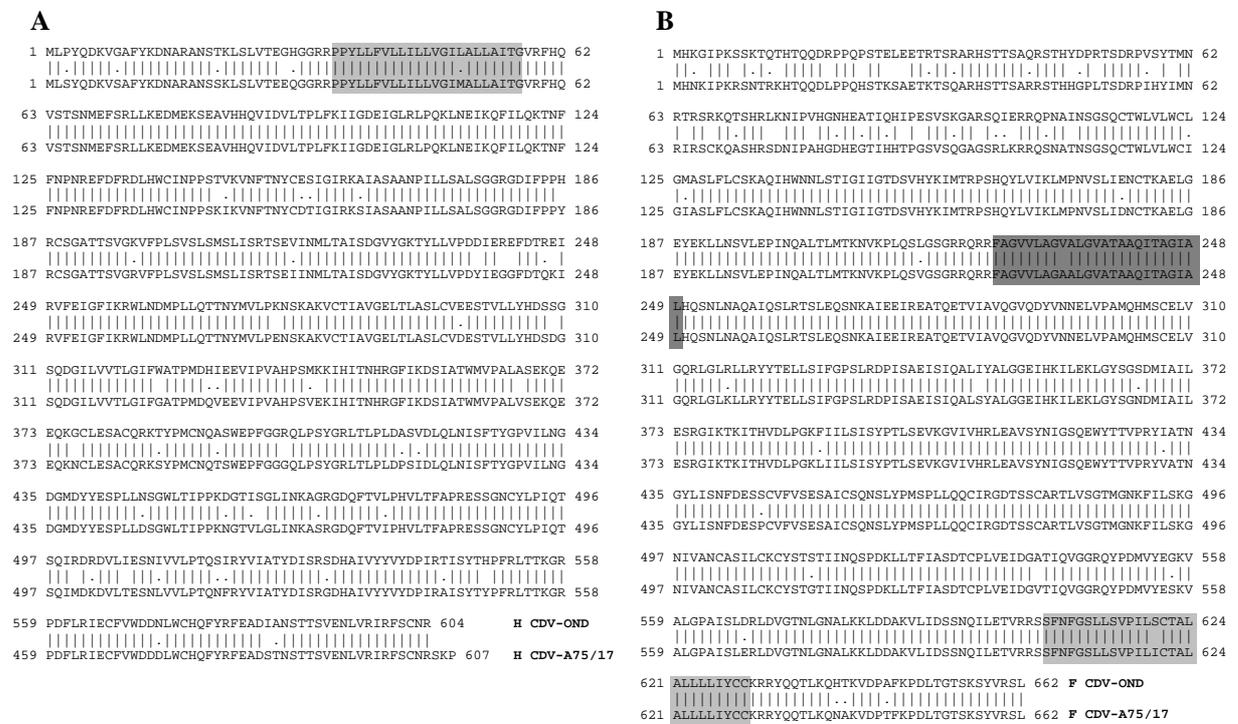


Abb. 5.4.: Sequenzvergleich des H- (A) und F-Proteins von CDV-OND und CDV-A75/17. Für diesen Sequenzvergleich wurden die in GenBank veröffentlichten Sequenzen einem Alignment mit dem Programm Jalview unterzogen. Die obere Reihe stellt jeweils die Sequenz von CDV-OND, die untere CDV-A75/17 dar. Die Transmembrandomäne ist jeweils hellgrau unterlegt und beim F-Protein ist zusätzlich der Bereich des Fusionspeptids dunkelgrau unterlegt.

Es ist anzunehmen, dass die Fähigkeit zur Synzytien-Induzierung als Folge der Attenuierung und Zellkulturadaptation auf Veränderungen in der Sequenz der viralen Proteine zurückzuführen ist. Eine Folge dieser Veränderungen ist der breite Zelltropismus, den die attenuierten Laborstämme im Vergleich zu den Wildstämmen besitzen. Für Morbilliviren konnte gezeigt werden, dass der Zelltropismus und die Art des zytopathischen Effekts außer von wirtszellspezifischen Faktoren vor allem vom H- und F-Protein bestimmt wird (Stern et al., 1994, Johnston et al., 1999). Leider wurde bei CDV bisher nur für den Onderstepoort-Impfstamm (OND) und den Wildstamm A75/17 die Sequenz des H-Proteins ermittelt (Abb. 5.4). Veröffentlichungen zeigen aber, dass das Onderstepoort H eine etwas geringere apparente Masse zeigt als das H von A75/17, Rockburn und diversen Wild-Isolaten, was auf weniger N-Glykosylierungsstellen zurückzuführen ist (Cherpillod et al., 1999, Örvell 1980). Die H-Proteine von OND und A75/17 weisen einen Unterschied von 57 Aminosäuren auf, deren Positionen gleichmäßig über das gesamte Protein verteilt sind. Welche Aminosäuren dabei wichtig für die Rezeptorbenutzung und die Rezeptorbindung des CDV-H sind ist nicht bekannt. Es kann aber bei den Morbilliviren, wie am Beispiel des Masernvirus gezeigt, schon der Austausch von wenigen Aminosäuren eine Veränderung in der Rezeptorbenutzung bewirken. Beim Masernvirus determinieren die Aminosäuren an Position 451 und 481, ob ein Masern-Stamm CD46 als Rezeptor benutzt oder nicht. Ein Alignment der H-Sequenz des Masern-Stammes Edmonston mit den CDV-Stämmen OND und A75/17 zeigt aber bei CDV an den homologen Positionen keinen Unterschied zwischen OND und A75/17. Bei CDV dürften also der Austausch von Aminosäureresten an anderen Positionen des H-Proteins für den im Vergleich zum CDV-A75/17 breitgefächerten Bindungstropismus von CDV-OND verantwortlich sein.

Auch im F-Protein bestehen deutliche Unterschiede zwischen OND und den Stämmen A75/17, Rockburn und Han2544/95. Wie Abbildung 5.4 zeigt unterscheidet sich dabei OND von A75/17 an 61 Positionen der F-Aminosäuresequenz.

Interessanterweise findet man 46 (75%) dieser Unterschiede gehäuft in dem nur 224 Aminosäuren langen F₂-Teil des Fusionsproteins. In wieweit sich die Unterschiede im F₂ auf die Zell-Zell-Fusion auswirken können ist unklar, da über die Rolle des F₂ an den Fusionsprozessen noch wenig bekannt ist. Es wird aber vermutet, dass die F₂-Proteine innerhalb eines F-Trimers miteinander interagieren und dass F₂ eventuell Anteil an den Konformationsänderungen während der Fusion hat. Ebenso wäre es denkbar, dass das Fusionsprotein über das F₂-Peptid mit den zellulären Membranproteinen interagiert, die eine Rolle bei der viral induzierten Zell-Zell-Fusion spielen. Veränderungen im F₂ könnten dann dazu führen, dass A75/17 mit diesen Membranproteinen nicht interagiert, während die SI-Stämme mit vielen dieser fusionsrelevanten Membranproteinen interagieren können und es so zur Synzytienbildung kommt.

Von den restlichen 15 Unterschieden im F₁-Teil findet man einen im Fusionspeptid, wobei es unwahrscheinlich ist, dass dieser einzelne Austausch die Ursache für die Synzytien-Induktion der von Onderstepoort abgeleiteten Stämme ist. 8 weitere Unterschiede findet man im Bereich zwischen HRA und HRB, 2 im HRB, einen in der TM-Domäne und 3 im zytoplasmatischen Ende. Gerade der Bereich zwischen den Heptad-Domänen scheint ja an den ersten Fusionsritten (s. Fusionsmodell Schritt 4) beteiligt zu sein. Die Aminosäureaustausche in diesem Teil des F₁-Proteins könnten deshalb fusionsbeeinflussende Auswirkungen auf die Struktur oder die Fähigkeit zu Konformationsänderungen in diesem Bereich haben. Es wäre also möglich, dass Sequenzunterschiede in diesem Bereich den unterschiedlichen Charakter der SI- und NSI-CDV-Stämme bewirken.

Von Rockburn ist bisher nur F₂ und das N-terminale Ende von F₁ sequenziert, während von Han2544/95 nur die Sequenz von F₁ bekannt ist. Ein Sequenzvergleich dieser beiden NSI-Stämme mit dem SI-Stamm Onderstepoort und dem Wild-Stamm A75/17 ist somit nur teilweise möglich. Ein Vergleich der F₂-Aminosäuresequenz von Rockburn, OND und A75/17 ergibt, dass Rockburn in diesem hochvariablen F₂-Bereich 86,8% mit OND und zu 94,4% mit A75/17 identisch ist, während bei OND und A75/17 nur 83,8% der Aminosäuren gleich sind. Die Sequenz des F₁ von Han2544/95 stimmt zu 95,3% mit OND und zu 97,2% mit A75/17 überein. Bei OND und A75/17 sind im F₁ 91,4% der Aminosäuren konserviert. Die Synzytieninduzierung der Onderstepoort-Stämme könnte demnach auch auf einer durch die Sequenzveränderungen verstärkten oder verbesserten Fusionsaktivität des F-Proteins beruhen. Bei den NSI-Stämmen sind im Lauf der Attenuierung und Adaption an die Zellkultur die hierfür notwendigen Mutationen der F-Sequenz eventuell unterblieben. Deshalb besitzt das F-Protein der NSI-Stämme eine engere Verwandtschaft zum F des Wild-Stamms A75/17 als zum F-Protein des OND-Stammes.

Die nähere Verwandtschaft der NSI-Stämme zum Wild-Stamm zeigt sich auch darin, dass Rockburn wie A75/17 in DBCC eine spontan persistente, nicht zytolytische Infektion mit langsamer Synzytienbildung etablieren, während OND in DBCC wie in den anderen Zelllinien eine zytolytische Infektion mit der charakteristischen schnellen und ausgeprägten Plaquebildung bewirkt. Auch Sequenzvergleiche des Matrixproteins und des Nukleoproteins zeigen eine größere Ähnlichkeit zwischen A75/17 und den NSI-Stämmen als zwischen SI- und NSI-Stämmen. Dies könnte sofern bedeutend für die viral induzierte Zell-Zell-Fusion sein, da bei den Morbilliviren das M-Protein ebenfalls Einfluß auf die Synzytienbildung hat (Cathomen et al., 1998) hat und in Interaktion mit dem N-Protein die Virus-Knospung steuert (Ray et al., 1991). Somit könnten auch Veränderungen der Aminosäuresequenz von M- und N-Protein bei den SI-Stämmen eine Verstärkung der Synzytienbildung bewirkt haben. Interessanterweise zeigt aber der Synzytium-induzierende Stamm A75/17-V, im Gegensatz zu Onderstepoort, im Matrix- und Nukleo-Protein nur wenige Abweichungen vom Wild-Stamm A75/17. Im Vergleich zu A75/17 finden sich im M-Protein (335 AS) bei A75/17-V 2 modifizierte Aminosäuren, bei Rockburn 2 und 13 bei Onderstepoort (Tab. 5.1). Das M-Protein in-

teragiert mit dem C-terminalen Bereich des N-Proteins (AS 351-523) (Stettler et al., 1997). Ein Sequenzvergleich dieses Bereiches ergibt für A75/17-V keinen Unterschied zum Wild-Stamm A75/17. Rockburn unterscheidet sich nur in einer Aminosäure von A75/17, Han2544/95 nur in drei Aminosäuren. Onderstepoort unterscheidet sich dagegen in 12 Aminosäuren von A75/17 (Tab. 5.1).

Matrix-Protein	A75/17	A75/17-V	Rockburn	OND
A75/17		99.40	98.81	96.12
A75/17-V	99.40		98.21	95.52
Rockburn	98.81	98.21		94.63
OND	96.12	95.52	94.63	

Nukleo-Protein	A75/17	A75/17-V	Rockburn	OND	Han2544/95
A75/17		100.00	99.50	94.18	98.27
A75/17-V	100.00		99.50	94.18	98.27
Rockburn	99.50	99.50		91.30	97.67
OND	94.18	94.18	91.30		91.28
Han2544/95	98.27	98.27	97.67	91.28	

Tabelle 5-1: Vergleich der Aminosäuresequenz des Matrix- und Nukleo-Proteins verschiedener CDV-Stämme. Die Unterschiede zwischen den verschiedenen Stämmen werden als Prozentsatz an identischen Aminosäuren in der Sequenz der Proteine dargestellt. Die Sequenzen für den Vergleich sind der EMBL-Genbank und Stettler et al. (1997) entnommen.

Geht man davon aus, dass bei unterschiedlichen Zelllinien unterschiedliche fusionsrelevante Membranproteine an der Zellfusion beteiligt sind, könnte der unterschiedliche Charakter der SI- und NSI-Stämme in der Fähigkeit der Stämme, mit diesen Membranproteinen zu interagieren, begründet sein. Die deutlichen Sequenzveränderungen der viralen Glykoproteine, die sich gerade bei OND während der Attenuierung und Adaption ergaben, könnten dazu geführt haben, dass diese mit vielen der verschiedenen fusionsrelevanten Membranproteinen unterschiedlicher Zelllinien interagieren können. Dies wäre dann der Grund dafür, dass OND-Varianten in vielen Zelllinien zur Zell-Zell-Fusion führen, die NSI-Stämme aufgrund fehlender Interaktion zwischen viralen Glykoproteinen und zellulären Membranproteinen aber keine Synzytien induzieren.

Dass Wirtszell-abhängige Faktoren bedeutend für die Zell-Zell-Fusion sind, ergibt sich aus Infektionsversuchen verschiedener Zellarten mit den SI-Stämmen. Dabei zeigte sich, dass LOVO und CHO-Zellen mit CDV-OND infizierbar sind und auch infektiöses Virus produziert wird (siehe 4.1.2). Anders als bei infizierten Vero- oder HeLa-Zellen ist im Verlauf der Infektion bei diesen Zelllinien aber keine Synzytienbildung zu beobachten. Es scheinen also in diesen Zelllinien für die CDV-induzierte Zellfusion relevante Proteine entweder zu fehlen,

oder die viralen Glykoproteine sind nicht in der Lage, mit den vorhandenen zellulären Proteinen zu interagieren.

Wenn zudem auch Virusstamm-spezifische Unterschiede hinsichtlich der Art der zur Zellfusion benötigten zellulären Proteine bestehen, könnte dies erklären, weshalb die NSI-Stämme in keiner der verwendeten Zelllinien eine Plaquebildung hervorrufen. Dies wäre dann ebenfalls auf fehlende oder nicht kompatible fusionsrelevante Wirtszellproteine in allen verwendeten Zelllinien zurückzuführen. Ein Hinweis dafür ist, dass mit Rockburn oder mit dem Wild-Stamm A75/17 infizierte primäre Hundehirn-Zellkulturen (DBCC) eine zwar langsam entwickelnde aber deutliche Synzytienbildung zeigen (Zurbriggen et al., 1995, Stettler et al., 1996). Das folgende Modell gibt zusammengefasst die wahrscheinlichste Hypothese zur Rolle von CD9 und zellulären Oberflächenproteinen bei der viral induzierten Zellfusion wieder:

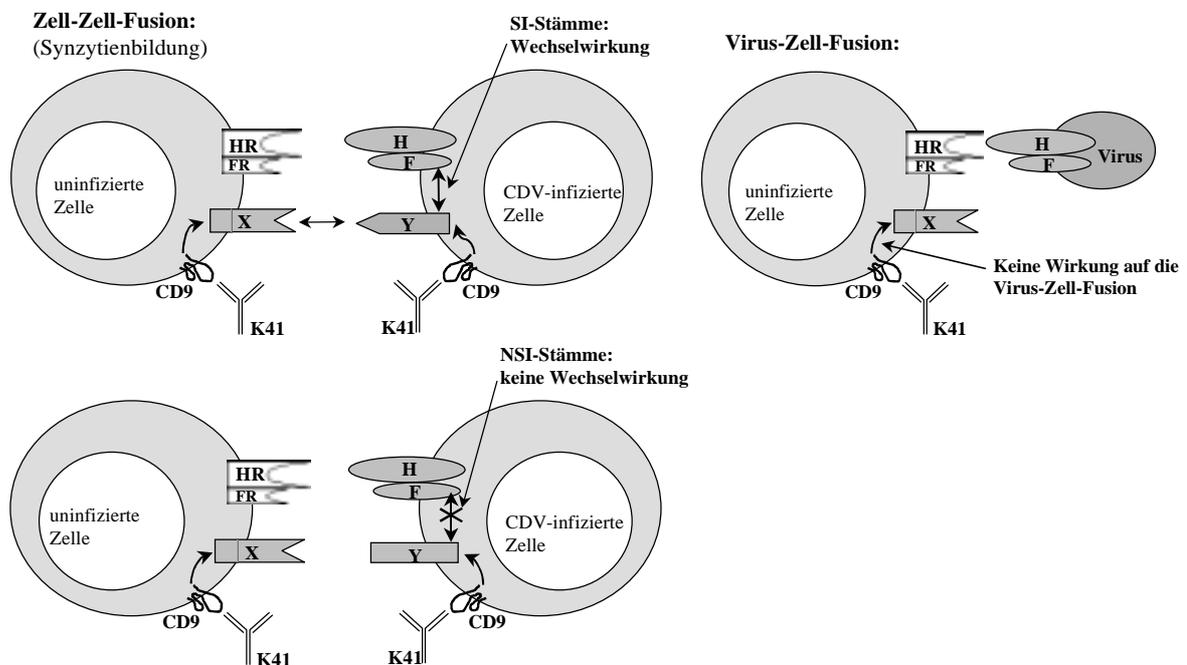


Abb. 5.5.: Modell der Rolle von CD9 bei der stammspezifischen Zell-Zell-Fusion und der Virus-Zell-Fusion. Da die Zell-Zell-Fusion virusstammspezifisch erfolgt, liegt vermutlich eine stammspezifische Interaktion viraler Hüllproteine (H/F) mit zellulären Molekülen (Y) vor. Diese Moleküle können virusstammspezifisch aktiviert werden. Anti-CD9-Antikörper lösen über CD9 ein Signal aus, das die für die Zell-Zell-Fusion wichtige Interaktion der zellulären Moleküle X und Y inhibiert. Dies findet wahrscheinlich sowohl auf Seite der uninfizierten, als auch der infizierten Zelle statt (vgl. 5.4.3). Bei der Virus-Zell-Fusion hat dieses negative Signal keine Wirkung, da auf der Virusoberfläche keine Interaktionspartner für das zelluläre Molekül X vorhanden sind.

6.1 Zusammenfassung

Die Infektion einer Zelle und die Virus-Ausbreitung von Zelle zu Zelle in infiziertem Gewebe oder in der Zellkultur ist abhängig von der Fähigkeit des Virus, die Fusion von Membranen zu induzieren und somit die natürliche Barriere zwischen einzelnen Zellen zu überwinden. Neben den viralen Glykoproteinen sind dabei Proteine in der Membran der Wirtszelle ausschlaggebend für einen erfolgreichen Ablauf dieser Fusionsprozesse. Kürzlich konnten wir mit CD9, einem Mitglied der Tetraspann-Transmembran-Proteinfamilie, ein zelluläres Oberflächenmolekül identifizieren, welches bei einer Infektion von Zellen mit CDV an diesen Fusionvorgängen beteiligt ist: Transfektion eines CD9-Expressionsplasmids in CD9-negative Zellen erhöht deren Infizierbarkeit und CD9-Antikörper inhibieren die Infektion von Zellkulturen mit CDV (OND).

In der vorliegenden Arbeit wurde untersucht, welcher Mechanismus hinter der Hemmung der CDV-Infektion durch CD9-Antikörper steht. Es besteht keine Korrelation zwischen der Expression von CD9 und der Virusbindung an Zellen. Zudem konnte mit Antikörpern gegen CD9 die Bindung von CDV an Zellen nicht beeinträchtigt werden. Es konnte des weiteren kein unmittelbarer Effekt von CD9-Antikörpern auf die Virusaufnahme, sowie auf die virale mRNA- und Protein-Synthese festgestellt werden. Auch die posttranslationale Modifikation der viralen Proteine, wie die Spaltung des F₀-Proteins in F₁ und F₂, und ihre Expression an der Zelloberfläche verläuft in Gegenwart von mAK K41 normal.

Durch Antikörper gegen CD9 wird jedoch die Synzytienbildung in infizierten Zellkulturen stark gehemmt und die Freisetzung neuer Viruspartikel verringert. Untersuchungen der Fusion von uninfizierten mit persistent CDV-infizierten HeLa-Zellen zeigten, dass mAK K41 direkt die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion beeinflusst. Dabei wird aber kein Teilschritt des Fusionsprozesses, wie z.B. die Hemifusion, vollständig blockiert, da die Synzytienbildung selbst durch den Einsatz hoher Konzentrationen an mAK K41 nicht verhindert werden kann.

Die Reduktion der Virustiter und der viralen mRNA-Mengen, die man etwa ab 18 Stunden nach Infektion in Gegenwart von mAK K41 beobachtet, entspricht der Reduktion, die man in Gegenwart eines fusionsinhibierenden Peptids (FIP) beobachtet. In beiden Fällen ist diese Reduktion höchstwahrscheinlich ein Sekundäreffekt der Inhibition der Infektionsausbreitung durch Synzytienbildung.

Bei CDV kann zwischen Stämmen, die Synzytien induzieren und Stämmen, die in infizierten Zellkulturen keine oder nur sehr geringe Plaquebildung zeigen, unterschieden werden. Diese Unterschiede basieren auf Sequenzunterschieden in den viralen Glykoproteinen H und F, die bei Morbilliviren für die Art des zytopathischen Effekts verantwortlich sind. Bei den Stämmen, die keine Synzytien induzieren, und dem Wildstamm A75/17 haben Antikörper gegen CD9 keinen inhibierenden Effekt auf die Infektion und es sind in Zellkulturen keine Unterschiede im Infektionsverlauf in An- oder Abwesenheit von mAK K41 zu beobachten. Die Hemmbar-

keit einer CDV-Infektion durch CD9-Antikörper ist also abhängig von der Fähigkeit des jeweiligen Stammes Synzytien zu induzieren.

Aus den vorliegenden Daten kann geschlossen werden, dass CD9-Antikörper spezifisch die CDV-induzierte Zell-Zell-Fusion hemmen, nicht aber die Virus-Zell-Fusion. Im Gegensatz zur Virus-Zell-Fusion scheint die virusstammspezifische Induktion der Zell-Zell-Fusion, neben dem zellulären Rezeptormolekül, noch von weiteren Interaktionen der viralen Hüllproteine mit anderen Zelloberflächenmolekülen abhängig zu sein. Es ist anzunehmen, dass CD9 dabei direkt oder indirekt mit diesen Oberflächenmolekülen interagiert und somit Einfluß auf die Zellfusion hat. Bei der CDV-Infektion bewirken CD9-Antikörper eine Verzögerung der Synzytienbildung, während sie bei der NDV-Infektion zu einer verstärkten Synzytienbildung führen.

Neben dem bereits bekannten fusionregulierenden Protein FRP-1/CD98 konnte so mit CD9 ein weiteres Membranprotein identifiziert werden, das an der Regulierung verschiedener viral-induzierter Zellfusionsvorgänge, aber auch an Zellfusionen im Zuge der Zelldifferenzierung und Entwicklung beteiligt ist. Die Regulierung der Fusion scheint aber bei CD9 und FRP-1 auf unterschiedlichen Mechanismen zu beruhen, da Antikörper gegen die beiden Membranproteine bei NDV-infizierten Zellen die Zell-Zell-Fusion stimulieren, FRP-1-Antikörper aber keinen Einfluß auf die CDV-induzierte Zellfusion haben.

Obwohl einige Interaktionspartner von CD9, wie z.B. Integrine, bekannt sind, konnte der Mechanismus der Regulation der Zell-Zell-Fusion durch CD9-Antikörper noch nicht aufgeklärt werden. Die vorliegende Arbeit zeigt zum ersten mal Unterschiede in der Virus-Zell- und Zell-Zell-Fusion bei Paramyxoviren auf und ist ein erster Schritt zu einem besseren Verständnis des Unterschiedes zwischen zellulären und viralen Fusionsvorgängen.

6.2 Summary

Infection of cells and the cell-to-cell spread of a virus in infected tissues as well as in tissue culture depends on the capacity of the virus to induce membrane fusions overcoming the natural barriers between cells. Apart from the viral glycoproteins host cell membrane proteins are essential for successful fusion events. Recently, we found that in CDV infected cell cultures CD9, a member of the tetraspan transmembrane 4 superfamily, takes part in these fusion processes: Expression of CD9 in CD9-negative cell lines enhanced CDV infection, whereas anti-CD9 antibodies inhibited the infection of cells with the Onderstepoort strain of CDV.

In this thesis I investigated which step of the CDV-infection is impaired by anti-CD9 antibodies. There is no correlation between the CD9-expression level and the binding of virus to target cells. Moreover antibodies against CD9 do not impair the binding of virus to cells. Neither the virus uptake, nor viral mRNA or protein levels are directly affected by anti-CD9-antibodies. Furthermore, the processing of viral proteins including cleavage of the F protein and the surface expression of viral proteins appears to be normal in presence of mAb K41.

However, what is drastically affected by mAb K41 is the syncytium formation in infected cultures and virus release. In a fusion assay of uninfected with persistently infected HeLa cells, we found that mAb K41 directly impaires the CDV-induced cell-cell fusion. Yet none of the single steps of a fusion event, like f.e. hemifusion, is totally blocked, since even large amounts of mAb K41 cannot abolish the formation of syncytia.

The reductions of the virus yield and of viral mRNA levels observed late after infection in the presence of mAb K41 are similar to those observed in the presence of a fusion inhibiting peptide (FIP), and therefore most likely are a secondary effect of the inhibition of syncytium formation.

In case of CDV one can differentiate between syncytium-inducing strains and strains which don't induce the formation of syncytia in infected cell cultures. This is probably due to sequenz differences of the H and F glycoproteins, which govern the type of cytopathic effect of Morbilliviruses. In cultures infected with non-syncytium-inducing strains or the wildstrain A75/17 anti-CD9-antibodies show no sign of inhibiting the infection and there is no difference in the progress of CDV-infection in absence or presence of mAb K41. Therefore the possibility to inhibit a CDV-infection by anti-CD9-antibodies depends on whether the used strain induces syncytium-formation or not.

From these data we conclude that antibodies against CD9 specifically inhibit the CDV-induced cell-cell fusion, but not the virus-cell fusion. This indicates that the cell-to-cell spread and the infection of cells with extracellular virus are differentially regulated steps dependent on certain combinations and interactions of viral envelope proteins and cell surface molecules. It is probable that CD9 influences cell-cell-fuion by direct or indirect interaction with these

surface molecules. CD9-antibodies delay the CDV-induced syncytium-formation and stimulate the NDV-induced syncytium-formation.

Beside the already known fusion regulation proteins FRP-1/CD98 and FRP-2 we found in CD9 another membrane protein that is involved in cell-cell-fusion induced by viruses or induced in the course of cell-differentiation and development. However, the mechanism by which CD9 and FRP-1/CD98 regulate fusion seem to be different, since antibodies against both proteins stimulate the NDV-induced cell-fusion but FRP-1-antibodies show no effect on CDV-induced cell-fusion.

Although molecules interacting with CD9, such as integrins, are known, the mechanism by which antibodies to CD9 regulate cell-cell fusion could not be unraveled yet. The presented thesis demonstrates for the first time differences in virus-cell fusion and cell-cell fusion induced by paramyxoviruses and is a first step for the understanding of differences between viral and cellular fusion processes.

7. Literaturverzeichnis

- Alberts, B., Bray, D., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. and Watson, J.D. 1994. *Molecular Biology of the cell*. 3rd. Edition, Garland Publishing, Inc., New York, p. 644
- Alkhatib G, Richardson C, Shen SH. 1990. Intracellular processing, glycosylation, and cell-surface expression of the measles virus fusion protein (F) encoded by a recombinant adenovirus. *Virology* 175(1):262-70.
- Allen, I.V, S. McQuaid, J. McMahon, J. Kirk, and R. McConnel. 1996. The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. *J. Neuropath. Exp. Neurol.* 55: 471-480.
- Anton, E.S., M. Hadjiargyrou, P.H. Patterson, and W.D. Matthew. 1995. CD9 plays a role in Schwann cell migration in vitro. *J. Neurosci.* 15:584-595.
- Appel, M. 1969. Pathogenesis of canine distemper. *Am. J. Vet. Res.* 30: 1167-1182
- Appel, M. J. G., Reggiardo, C., Summers, B. A., Pearce-Kelling, S., Mare, C. J., Noon, T. H., Reed, R. E., Shively, J. N. & Orvell, C. 1991. Canine distemper virus infection in javelinas (collared Peccaries). *Archives of Virology* 119, 147-152.
- Appel, M.J.G. 1978. Reversion to virulence of attenuated canine distemper virus in vivo and vitro. *J.Gen.Virol.*, 41:385-393
- Appel, M.J.G., and J.H. Gillespie. 1972. Canine distemper virus. *Virology Monographs* 11: 1-96.
- Axthelm, M.K. and Krakowa, S. 1987. Canine distemper virus: early blood-brain barrier lesion. *Acta Neuropathol.* 75:27-33
- Baker, K. A., R. E. Dutch, R. A. Lamb, and T. S. Jardetzky. 1999. Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Mol. Cell* 3: 309-319.
- Bandres, J. C., Wang, Q. F., O'Leary, J., Baleaux, F., Amara, A., Hoxie, J. A., Zolla-Pazner, S., and Gorny, M. K. 1998. Human Immunodeficiency Virus (HIV) Envelope Binds to CXCR4 Independently of CD4, and Binding Can Be Enhanced by Interaktion with Soluble CD4 or by HIV Envelope Deglycosylation. *J. Virol.* 72:2500-2504.
- Barrett, T., I.K.G. Visser, L. Mamaev, L. Goatley, M.-F. van Bresseem, and A.D.M.E. Osterhaus, 1993. Dolphin and porpoise morbilliviruses are genetically distinct from phocine distemper virus. *Virology* 193: 1010-1012.
- Benkirane, M., Cobeau, P., Housset, V. and Devaux, C. 1993. An antibody that binds the immunoglobulin CDR3-like region of the CD4 molecule inhibits provirus transcription in HIV-infected T cells. *EMBO Journal* 12: 4909-4921
- Benoit, P., M.S. Gross, P. Frchet, J. Frezal, G. Uzan, C. Boucheix, and V.C. Nguyen. 1991. Assignment of the human CD9 gene to chromosome 12 (region P13) by use of human specific DNA probes. *Hum. Genet.* 86: 268-272.

- Benson, R. E., Sanfridson, A., Ottinger, J. S., Doyle, C., and Cullen, B. R. 1993. Downregulation of cell-surface CD4 expression by simian immunodeficiency virus Nef prevents viral superinfection. *J. Exp. Med.* 177: 1561-1566.
- Berditchevski, F. and Odintsova, E. 1999. Characterization of Integrin–Tetraspanin Adhesion Complexes: Role of Tetraspanins in Integrin Signaling. *J. Cell Biol.* 146: 477-492.
- Bergelson, J. M., Chan, M., Solomon, K. R., John, N. F. St., Lin, H. and Finberg, R. W. 1994. Decay-accelerating factor (CD55) , a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein, is a receptor for several echoviruses. *PNAS* 91:6245
- Bergelson, J. M., Shepley, M. P., Chan, B. M., Hemler, M. E., and Finberg, R. W. 1993. Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* 255:1718
- Bhat, S., Spitalnik, F., Gonzalez-Scarano, F. and Silberberg, D. H. 1991. Galactosyl ceramide or a derivative is an essential component of the neural receptor for human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein gp120. *PNAS* 88:7131
- Blixenkron-Møller, M., Svansson, V., Have, P., Orvell, C., Appel, M., Pedersen, I. R., Dietz, H. H. & Henriksen, P. (1993). Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Veterinary Microbiology* 37, 163-173.
- Boucheix, C., P. Benoit, P. Frachet, M. Billard, R.E. Worthington, J. Gagnon, and G. Uzan. 1991. Molecular cloning of the CD9 antigen. A new family of cell surface proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 117-122.
- Bousse T, Takimoto T, Gorman WL, Taka-hashii T, Portner A. 1994. Regions on the hemagglutinin-neuraminidase proteins of human parainfluenza virus type-1 and Sendai virus important for membrane fusion. *Virology* 204: 506–14
- Bousse, T., Takimoto, T. and Portner, A. 1995. A single amino acid changes enhances the fusion promotion activity of human parainfluenza virus type 1 hemagglutinin-neuraminidase glycoprotein. *Virology* 209(2): 654-657
- Brown, J.G., Almond, B.D., Naglich, J.G. and Eidels, L. 1993. Hypersensitivity to diphtheria toxin by mouse cells expressing both diphtheria toxin receptor and CD9 antigen. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8184-8188.
- Buchholz, C.J., Schneider, U., Devaux, P., Gerlier, D., and Cattaneo, R. 1996. Cell entry by measles virus: long hybrid receptors uncouple binding from membrane fusion. *J. Virol.* 70: 3716-3723.
- Buckland, R., and F. Wild. 1989. Leucine zipper motif extends. *Nature (London)* 338: 547.
- Buckland, R., E. Malvoisin, P. Beauverger, and F. Wild. 1992. A leucine zipper structure present in the measles virus fusion protein is not required for its tetramerization but is essential for fusion. *J. Gen. Virol.* 73: 1703–1707.
- Bussell, R.H. and Karzon, D.T. 1965. Canine distemper virus in primary and continuous cell lines of human and monkey origin. *Arch. Ges. Virusforsch.* 17: 163-182.

- Carroll, R.C., Worthington, R.E. and Boucheix, C. 1990. Stimulus-response coupling in human platelets activated by monoclonal antibodies to the CD9 antigen, a 24 kDa surface-membrane glycoprotein. *Biochem. J.* 266: 527-535.
- Cathomen, T. Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M.A. and Cattaneo, R. 1998. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *EMBO Journal* 17: 3899-3908
- Cattaneo, R., and J. K. Rose. 1993. Cell fusion by the envelope glycoproteins of persistent measles viruses which caused lethal human brain disease. *J. Virol.* 67 : 1493–1502.
- Cattaneo, R., Rebmann, G. Baczko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A. 1987. Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology* 160:523-526.
- Ceruti-Sola, S. , Kristensen, F., Vandeveld, M., Bichse, P. , Kihm, U. 1983. Lymphocyte responsiveness to lectin and myelin antigens in canine distemper infection in relation to the development of demyelinating lesions. *J. Neuroimmunol.* 4: 77-90.
- Ceruti-Sola, S., F. Kristensen, M. Vandeveld, P. Bichse, and U. Kihm. 1983. Lymphocyte responsiveness to lectin and myelin antigens in canine distemper infection in relation to the development of demyelinating lesions. *J. Neuroimmunol.* 4: 77-90.
- Chambers P, Pringle CR, Easton AJ. 1990. Heptad repeat sequences are located adjacent to hydrophobic regions in several types of virus fusion glycoproteins. *J. Gen. Virol.* 71: 3075–80
- Chen, M.S., K.S. Tung, S.A. Coonrod, Y. Takahashi, D. Bigler, A. Chang, Y. Yamashita, P.W. Kincade, J.C. Herr, and J.M. White. 1999. Role of the integrin-associated protein CD9 in binding between sperm ADAM 2 and the egg integrin alpha6beta1: implications for murine fertilization. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 96: 11830–11835.
- Cherpillod, P., K. Beck, A. Zurbriggen, and R. Wittek. 1999. Sequence analysis and expression of the attachment and fusion proteins of canine distemper virus wild-type strain A75/17. *J. Virol.* 73: 2263-2269.
- Cosby, S L., Macquaid, S., Taylor, M.J., Bailea, M., Rima, B.K., Martin, S.J. and Allen, I.V. 1989. Examination of eight cases of multiple sclerosis and 56 neurological and non-neurological controls for genomic sequences of measles virus. *J.Gen. Virol.* 70: 2027-2036
- Daenke, S., McCracken, S.A. and Booth, S. 1999. Human T-cell leukaemia/lymphoma virus type 1 syncytium formation is regulated in a cell-specific manner by ICAM-1, ICAM-3 and VCAM-1 and can be inhibited by antibodies to integrin β_2 or β_7 . *J. Gen. Virol.* 80: 1429-1436.
- Dalgleish, A. G., Beveriev, P. C. L., Clapham, P. R., Crawford, D. H., Greaves, M. F., and Weiss, R.A. 1984. The CD4 (T4) antigen is an essential component of the receptor for the AIDS retrovirus. *Nature* 312:763
- Damico, R.L., Crane, J., and Bates, P. 1998. Receptor-triggered membrane association of a model retroviral glycoprotein. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 95: 2580-2585
- Deng, R., Z. Wang, A. M. Mirza, and R. M. Iorio. 1995. Localization of a domain on the paramyxovirus attachment protein required for the promotion of cellular fusion by its homologous fusion protein spike. *Virology* 209: 457–469.

- Deves, R. and C.A.R. Boyd. 2000. Surface Antigen CD98(4F2): Not a Single Membrane Protein, But a Family of Proteins with Multiple Functions. *J. Membrane Biol.* 173, 165–177.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., et al. 1996. HIV-1 entry into CD4⁺ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667-673.
- Duprex, W.P., I. Duffy, S. McQuaid, L. Hamill, S.L. Cosby, M.A. Billeter, J. Schneider-Schaulies, V. ter Meulen, and B.K. Rima. 1999. The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain. *J. Virol.* 73: 6916-6922.
- Duprex, W.P., S. McQuaid, L. Hangartner, M.A. Billeter, and B.K. Rima. 1999. Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J. Virol.* 73: 9568-9575.
- Dutch, R. E., G. P. Leser, and R. A. Lamb. 1999. Paramyxovirus fusion protein: characterization of the core trimer, a rod-shaped complex with helices in anti-parallel orientation. *Virology* 254: 147–159.
- Ebata, S. N., M.-J. Cote, C. Y. Kang, and K. Dimock. 1991. The fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins of human parainfluenza virus 3 are both required for fusion. *Virology* 183: 437–441.
- Endres, M. J., Clapham, P. R., Marsh, M., Ahuja, M. et al. 1996 CD4-Independent Infection by HIV-2 Is Mediated by Fusin/CXCR4. *Cell* 87:745-756.
- Erlenhöfer, C., Wurzer, W.J., Löffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. 2001. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus, but not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J. Virol.* in press.
- Fantini, J., Cook, D. G., Nathanson, N., Spitalnik, S. L., and Gonzalez-Scarano, F. 1993. Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *PNAS* 90:2700
- Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. 1996. HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven transmembrane, G protein coupled receptor. *Science* 272:872-877.
- Firsching, R. 1999. Untersuchungen der Rezeptorbenutzung und –Modulation durch Masernvirus Impf- und Wildstämme. Dissertation. Universität Würzburg.
- Firsching, R., C.J. Buchholz, U. Schneider, R. Cattaneo, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. 1999. Measles virus spread by cell-cell contacts: uncoupling of contact-mediated receptor (CD46) downregulation from virus uptake. *J. Virol.* 73: 5265-5273.
- Fournier P, Brons NH, Berbers GA, Wiesmuller KH, Fleckenstein BT, Schneider F, Jung G, Muller CP. 1997. Antibodies to a new linear site at the topographical or functional interface between the haemagglutinin and fusion proteins protect against measles encephalitis. *J Gen Virol* 1997 Jun;78 (Pt 6):1295-302.
- Freidman, A.W., Diaz, L.A. Jr., Moore, S., Schaller, J., Fox, D.A. 1994. *Cell Immunol.* 154:253–263

- Fukudome, K., Furuse, M., Imai, T., Takagi, S., Nishimura, M., Himuma, Y. and Yoshie, O. 1992. Identification of membrane antigen C33 recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T cell leukemia virus type 1-induced syncytium formation: altered glycosylation of C33 antigen in HTLV-1-positiv T cells. *J. Virol.* 66: 1394-1401.
- Gemma, T., Watari, T., Akiyama, K., Miyashita, N., Shin, Y.-S., Iwatsuki, K., Kai, C. & Mikami, T. 1996. Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *Journal of Veterinary Medical Science* 58, 547-550.
- Gething M-J, Doms RW, York D, White JM. 1986. Studies on the mechanism of membrane fusion: site-specific mutagenesis of the hemagglutinin of influenza virus. *J. Cell Biol.* 102: 11-23.
- Gordon, M.T., Bell, S.C., Mee, A.P., Mercer, S., Carter, S. and Sharpe, P.T. 1993. Prevalence of canine distemper antibodies in the pagetic population. *J. Med. Virol.* 40: 284-292.
- Gray C, Tatulian SA, Wharton SA, Tamm LK. 1996. Effect of the N-terminal glycine on the secondary structure, orientation and in-teraction of the influenza hemagglutinin fusion peptide with lipid bilayers. *Biophys. J.* 70: 2275-86.
- Gutman O, Danieli T, White JM, Henis YI. 1993. Effects of exposure to low pH on the lateral mobility of influenza hemagglutinin expressed at the cell surface. *Biochemistry* 32: 101-106.
- Guy HR, Durell SR, Schoch C, Blumenthal R. 1992. Analyzing the fusion process of influenza hemagglutinin by mutagenesis and molecular modeling. *Biophys. J.* 62: 95-97.
- Haas, L., Liermann, H., Harder, TC., Barrett, T., Lochelt, M., von Messling, V., Baumgartner, W. and Greiser-Wilke, I. 1999. Analysis of the H gene, the central untranslated region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper viruses. *Vet Microbiol.* 69 (1-2): 15-8
- Haig, D. A. 1956. Canine distemper: immunization with avanized virus. *Onderstepoort Journal of Veterinary Research* 17: 19-53.
- Hamburger, D., Griot, C., Zurbriggen, A., Örvell, C. and Vandeveld, M. 1991. Loss of virulence of cnine distemper virus is associated with structural change recognized by a monoclonal antibody. *Experientia* 47: 842-845.
- Harder, T. C and Osterhaus, A. D. M. E. 1997. Canine distemper virus-a morbillivirus in search of new hosts? *Trends in Microbiol.* 5, 120-124
- Harder, T. C., Kenter, M., Appel, M. J. G., Roelke-Parker, M. E., Barrett, T. & Osterhaus, A. D. M. E. 1995. Phylogenetic evidence of canine distemper virus in Serengeti's lions. *Vaccine* 13, 521-523.
- Harder, T. C., Kenter, M., Vos, H., Siebelink, K., Huisman, W., Van Amerongen, G., Orvell, C., Barrett, T., Appel, M. J. G. & Osterhaus, A. D. M. E. 1996. Canine distemper virus from diseased large felids : biological properties and phylogenetic relationships. *Journal of General Virology* 77, 397-405.

- Harder, T. C., Klusmeyer, K., Frey, H.-R., Orvell, C. & Liess, B. 1993. Intertypic differentiation and detection of intratypic variants among canine and phocid morbillivirus isolates by kinetic neutralization using a novel immunoplaque assay. *Journal of Virological Methods* 41, 77-92.
- Harouse, J. M., Bhat, S., Spitalnik, S. L., Laughlin, M., Stefano, K., Siberberg, D. H., and Gonzalez-Scarano, F. 1991. Inhibition of HIV-1 in Neural Cell Lines by Antibodies Against Galactosyl Ceramide. *Science* 253:320-323.
- Hato, T., Sumida, M. Yasukawa, M. Watanabe, A., Okuda, H. and Kobayashi, Y. 1990. Induction of platelet Ca^{2+} influx and mobilisation by a monoclonal antibody to CD9 antigen. *Blood* 75: 1087-1091.
- Heminway BR, Yu Y, Tanaka Y, Perrine KG and Gustafson E. 1994. Analysis of respiratory syncytial virus F, G, and SH proteins in cell fusion. *Virology* 200: 801-5
- Hemler, M.E., B.A. Mannion, and F. Berditchevski. 1996. Association of TM4SF proteins with integrins: relevance to cancer. *Biochim. Biophys. Acta.* 1287: 67-71.
- Henis, Y.I., Herman-Barhom, Y., Aroeti, B., and Gutman, O. 1989. Lateral mobility of both envelope proteins (F and HN) of Sendai virus in the cell membrane is essential for cell-cell fusion. *J. Biol. Chem.* 264(29): 17119-25.
- Hernandez, L. D., L. R. Hoffman, T. G. Wolfsberg, and J. M. White. 1996. Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu. Rev. Cell Biol.* 12: 627-661.
- Hernandez, L. D., Peters, R.J., Delos, S.E., Young, J.A.T., Agard, D.A., and White, J.M. 1997. Activation of a retroviral membrane fusion protein: soluble receptor-induced liposome binding of the ALSV envelope glycoprotein. *J. Cell Biol.* 139: 1455-1464
- Herrler, G., Rott, R., Klenk, H.-D., Müller, H.-P., Shukla, A. K. and Schauer, R. 1985. The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is a neuraminidase-O-acetyltransferase. *EMBO J.* 4:1503
- Horejsi, V., and P. Vlcek. 1991. Novel structurally distinct family of leukocyte surface glycoproteins including CD9, CD37, CD53 and CD63. *FEBS Lett.* 288: 1-8.
- Horvath, C. M., R. G. Paterson, M. A. Shaughnessy, R. Wood, and R. A. Lamb. 1992. Biological activity of paramyxovirus fusion proteins: factors influencing formation of syncytia. *J. Virol.* 66: 4564-4569.
- Hosie, M.J., Willet, B.J., Dunsford, T.H., Jarret, O. and Neil, J.C. 1993. A monoclonal antibody which blocks infection with feline immunodeficiency virus identifies a possible non-CD4 receptor. *J. Virol.* 67: 1667-1671
- Hu, X., R. Ray, and R. W. Compans. 1992. Functional interactions between the fusion protein and hemagglutinin-neuraminidase of human parainfluenzaviruses. *J. Virol.* 66: 1528-1534.
- Imai, T. and O. Yoshie. 1993. C33 antigen and M38 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to syncytium formation by human T cell leukemia virus type 1 are both members of the transmembran 4 superfamily and associate with each other and with CD4 and CD8 in T cells. *J. Immunol.* 151: 6470-6481.

- Imai, T., K. Fukudome, S. Takagi, M. Nagira, M. Furuse, N. Fukuhara, M. Nishimura, Y. Himuma, and O. Yoshie. 1992. C33 antigen recognized by monoclonal antibodies inhibitory to human T cell leukemia virus type 1-induced syncytium formation is a member of a new family of transmembrane proteins including CD9, CD37, CD53, and CD63. *J. Immunol.* 149: 2879-2886.
- Ito, Y., H. Komada, S. Kusagawa, M. Tsurudome, H. Matsumura, M. Kawano, H. Ohta, and M. Nishio. 1992. Fusion regulations proteins on the cell surface: isolation and characterization of monoclonal antibodies which enhance giant polykarocyte formation in Newcastle disease virus-infected cell lines of human origin. *J. Virol.* 66: 5999-6007.
- Ito, Y., M. Tsurudome, and M. Hishiyama. 1987. Induction of cell fusion in Newcastle disease virus-infected L929 cells by anti-L929 cell antisera. *J. Gen. Virol.* 68: 1261-1266.
- Iwamoto, R., Higashiyama, S., Mitamura, T., Taniguchi, N., Klagsbrun, M. and Mekada, E. 1994. Heparin-binding EGF-like growth factor, which acts as the diphtheria toxin receptor, forms a complex with membrane protein DRAP27/CD9, which up-regulates functional receptors and diphtheria toxin density. *EMBO J.* 13: 2322-2330.
- Jacqueline, M., Matthews, T.F., Young, S.P., Tucker and Mackay J.P. 2000. The core of the Respiratory Syncytial Virus fusion protein is a trimeric coiled coil. *J. Virol.* 74(13): 5911-20.
- Jauniaux T. 1998. *New Scientist* 24.10.1998 Seite 23.
- Jennings, L.K., C.F. Fox, W.C. Kouns, C.P. McKay, L.R. Ballou, and H.E. Schultz. 1990. The activation of human platelets mediated by anti-human platelet p24/CD9 monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 265: 3815-3822.
- Jennings, L.K., Fox, C.F., Kouns, W.C., McKay, C.P., Ballou, L.R. and Schultz, H.E. 1990. The activation of human platelets mediated by anti-human platelet p24/CD9 monoclonal antibodies. *J. Biol. Chem.* 265: 232-2330.
- Johnston, I.C.D., V. ter Meulen, J. Schneider-Schaulies, and S. Schneider-Schaulies. 1999. A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism. *J. Virol.* 73: 6903-6915.
- Joseph, B. S., and M. B. A. Oldstone. 1974. Antibody-induced redistribution of measles virus antigens on the cell surface. *J. Immunol.* 113: 1205-1209. 69: 5995-6004.
- Joshi, S. B., R. E. Dutch, and R. A. Lamb. 1998. A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology* 248: 20-34.
- Junankar PR, Cherry RJ. 1986. Temperature and pH dependence of the haemolytic activity of influenza virus and of the rotational mobility of the spike glycoproteins. *Biochim. Biophys. Acta* 854: 198-206.
- Kaji, K., S. Oda, T. Shikano, T. Ohnuki, Y. Uematsu, J. Sakagami, N. Tada, S. Miyazaki, and A. Kudo. 2000. The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice. *Nat. Genet.* 24: 279-282.
- Katzir, Z., Gutman, O., and Henis, Y.I. 1989. Application of fluorescence photobleaching recovery to assess complex formation between the two envelope proteins of Sendai virus in membranes of fused human erythrocytes. *Biochemistry* 28(15): 6400-6405.

- Kiyoko Iwatsuki, Naoko Miyashita, Emi Yoshida, Tsuyoshi Gemma, Yeon-Sil Shin, Takeshi Mori, Norio Hirayama, Chieko Kai and Takeshi Mikami. 1997. Molecular and phylogenetic analyses of the haemagglutinin (H) proteins of field isolates of canine distemper virus from naturally infected dogs. *J. Gen. Virol.* 78: 373–380.
- Krakowa, S., Higgins, R.J. and Koestner, A. 1980. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.* 41: 284-292.
- Krakowka, S., R.J. Higgins, and A. Koestner. 1980. Canine distemper virus: review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.* 41: 284-292.
- Lamb, R. A. 1993. Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology* 197: 1–11.
- Lamb, R. A., and D. Kolakofsky. 1996. Paramyxoviridae: the viruses and their replication, p. 1177–1206. In B. N. Fields, D. M. Knipe, and P. M. Howley (ed.), *Fields virology*, 3rd ed., vol. 1. Lippincott-Raven, Philadelphia, Pa.
- Langedijk, J. P. M., Daus, F. J., and van Oirschot, J. T. 1997. Sequence and Structure Alignment of Paramyxoviridae Attachment Proteins and Discovery of Enzymatic Activity for a Morbillivirus Hemagglutinin. *J. Virol.* 71:6155-6167.
- Lanza, F., D. Wolf, C.F. Fox, N. Kieffer, J.M. Seyer, V.A. Fried, S.R. Coughlin, D.R. Phillips, and L.K. Jennings. 1991. CDNA cloning and expression of platelet p24/CD9. Evidence for a new family of multiple membrane-spanning proteins. *J. Biol. Chem.* 266: 10638-10645.
- Le Naour, F., E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Prenant, and C. Boucheix. 2000. Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science.* 287: 319–321.
- Löffler, S., F. Lottspeich, F. Lanza, D.O. Azorsa, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. 1997. CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J. Virol.* 71: 42-49.
- Lu M, Blacklow S, Kim PS. 1995. A trimeric structural domain of the HIV-1 transmembrane glycoprotein. *Nat. Struct. Biol.* 2: 1075–82.
- Lusso, P., Secchiero, P., Crowley, R. W., Garzino-Demo, A., Berneman, Z. N., and Gallo, R. C. 1994. CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: Interference with human immunodeficiency virus. *PNAS.* 91:3872
- Maecker, H.T., S.C. Todd, and S. Levy. 1997. The tetraspanin superfamily: molecular facilitators. *FASEB J.* 11: 428–442.
- Malvoisin, E., and T. F. Wild. 1993. Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the hemagglutinin and fusion proteins. *J. Gen. Virol.* 74: 2365–2372.
- Mamaev, L.V., I.K. Visser, S.I. Belikov, N.N. Denikina, T. Harder, L. Goatley, B. Rima, B. Edgington, A.D.M.E. Osterhaus, and T. Barrett. 1996. Canine distemper virus in lake Baikal seals (*phoca siberica*). *The Veterinary Record* 138: 437-439.
- Masatoshi Tajima, Shigeomi Higuchi, Yasumitsu Higuchi, Noriki Miyamoto, Atsumasa Uchida, Morihiro Ito, Machiko Nishio, Hiroshi Komada, Mitsuo Kawano, Shigeru Kusagawa, Masato Tsurudome and Yasuhiko Ito. 1999. Suppression of FRP-1/CD98-Mediated

- Multinucleated Giant Cell and Osteoclast Formation by an Anti-FRP-1/CD98 mAb, HBJ 127, That Inhibits c-src Expression. *Cellular Immunology* 193, 162–169.
- Masellis-Smith, A., and A.R.E. Shaw. 1994. CD9-regulated Adhesion. *J. Immunol.* 152: 2768-2777.
- McClure, J. E., 1992. Cellular receptor for Epstein-Barr virus. *Prog. Med. Virol.* 39:116.
- McQuaid, S., S. Campbell, I.J.C. Wallace, J. Kirk, and S.L. Cosby. 1998. Measles virus infection and replication in undifferentiated and differentiated human neuronal cells in culture. *J. Virol.* 72: 5245-5250.
- Mee AP, Dixon JA, Hoyland JA, Davies M, Selby PL, Mawer EB. 1998. Detection of canine distemper virus in 100% of Paget's disease samples by in situ reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *Bone* 23(2):171-5.
- Meissner, N., and K. Koschel. 1995. Downregulation of endothelin receptor mRNA synthesis in C6 rat astrocytoma cells by persistent measles virus and canine distemper virus infections. *J. Virol.* 69: 5191-5194.
- Melikyan GB, Niles WD, Peeples ME, Cohen, FS. 1993. Influenza hemagglutinin-mediated fusion pores connecting cells to planar membranes: flickering to final expansion. *J. Gen. Physiol.* 102: 1131–49.
- Michalak, M., Quackenbush, E. J., and Letarte, L., *J. Biol. Chem.* 261, 92, 1986.
- Miller, Brent J. , Georges-Labouesse, Elisabeth, Paul Primakoff, and Diana G. Myles. 2000. Normal Fertilization Occurs with Eggs Lacking the Integrin $\alpha 6 \beta 1$ and is CD9-dependent. 149 (6): 1289–1295.
- Miyado, K., G. Yamada, S. Yamada, H. Hasuwa, Y. Nakamura, F. Ryu, K. Suzuki, K. Kosai, K. Inoue, A. Ogura, M. Okabe, and E. Mekada. 2000. Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science.* 287: 321–324.
- Morell, V. (1996). New virus variant killed Serengeti cats. *Science* 271, 596.
- Morell, V. 1994. Serengeti's big cats going to the dogs. *Science* 264, 1664.
- Morrison, T., and Portner, A., 1991. Structure, function, and intracellular processing of the glycoproteins of paramyxoviridae. In D. W. Kingsbury (ed.), *The paramyxoviruses*. Plenum Press, New York. p. 347–375.
- Morrison, T., C. McQuain, and L. McGinnes. 1991. Complementation between a virulent Newcastle disease virus and a fusion protein gene expressed from a retrovirus vector: requirement for membrane fusion. *J. Virol.* 65: 813–822.
- Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T.F., Rossi, B., Roubardin-Combe, C., and Gerlier, D. 1993a. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.* 67: 6025-6032.
- Naniche, D., Wild, T.F., Roubardin-Combe, C., and Gerlier, D. 1993b. Measles virus haemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J. Gen. Virol.* 74: 1073-1079

- Norrby, E. 1971. The effect of a carboxy tripeptide on the biological activities of measles virus. *Virology* 44: 599-608.
- Norrby, E., and M. N. Oxman. 1990. Measles virus. In B. N. Fields and D. N. Knipe (ed.), *Virology*, p. 1013–1044, Vol. I. Raven Press, New York.
- Obeid, O.E., Partidos, C.D., Howard, C.R., Steward, M.W. 1995. Protection against morbillivirus-induced encephalitis by immunization with a rationally designed synthetic peptide vaccine containing B- and T-cell epitopes from the fusion protein of measles virus. *J. Virol.* 69:1420-1428.
- Ohgimoto, S., N. Tabata, S. Suga, M. Nishio, H. Ohta, M. Tsurudome, H. Komada, M. Kawano, N. Watanabe, and Y. Ito. 1995. Molecular characterization of fusion regulatory protein-1 (FRP-1) that induces multinucleated giant cell formation of monocytes and HIV gp160-mediated cell fusion: FRP-1 and 4F2/CD98 are identical molecules. *J. Immunol.* 135: 3585-92.
- Ohgimoto, S., Tabata, N., Suga, S., Tsurudome, M., Kawano, M., Nishio, M., Okamoto, K., Komada, H., Watanabe, N., and Ito, Y. 1996. Regulation of human immunodeficiency virus gp160-mediated cell fusion by antibodies against fusion regulatory protein 1. *J. Gen. Virol.* 77, 2747–2756
- Ohta, H., M. Tsurudome, H. Matsumura, Y. Koga, S. Morikawa, M. Kawano, S. Kusugawa, H. Komada, M. Nishio, and Y. Ito. 1994. Molecular and biological characterization of fusion regulatory proteins (FRPs): anti-FRP mAb induced HIV-mediated cell fusion via an integrin system. *EMBO J.* 13: 2044-2055.
- Okamoto, K., M. Tsurudome, S. Ohgimoto, M. Kawano, M. Nishio, H. Komada, M. Ito, Y. Sakakura, and Y. Ito. 1997. An anti-fusion regulatory protein-1 monoclonal antibody suppresses human parainfluenza virus type 2-induced cell fusion. *J. Gen. Virol.* 78: 83-89.
- Ooi CG, Walsh CA, Gallagher JA and Fraser WD. 2000. Absence of measles virus and canine distemper virus transcripts in long-term bone marrow cultures from patients with Paget's disease of bone. *Bone* 27(3):417-21.
- Ozaki, Y., K. Satoh, K. Kuroda, R. Qi, Y. Yatomi, S. Yanagi, K. Sada, H. Yamamura, M. Yanabu, S. Nomura, and S. Kume. 1995. Anti-CD9 monoclonal antibody activates p72syk in human platelets. *J. Biol. Chem.* 270: 15119-15124.
- Ozaki, Y., Y. Matsumoto, Y. Yatomi, M. Higashihara, and S. Kume. 1990. Two-step mobilization of arachidonic acid in platelet activation induced by low concentrations of TP82, a monoclonal antibody against CD9 antigen. *Eur. J. Biochem.* 199: 347-354.
- Parseval, De A., D.L. Lerner, P. Borrow, B.J. Willett, and J.H. Elder. 1997. Blocking of feline immunodeficiency virus infection by a monoclonal antibody to CD9 is via inhibition of virus release rather than interference with receptor binding. *J. Virol.* 71: 5742-5749.
- Paterson RG, Harris TJ, Lamb RA. 1984 . Analysis and gene assignment of mRNAs of a paramyxovirus, simian virus 5. *Virology* Oct 30;138(2):310-23.
- Pearce Kelling, S., Mitchell, W.J., Summers, B.A. and Appel, M.J. 1990. Growth of canine distemper virus in cultured astrocytes: Relationship to in vivo persistence and disease. *Microb. Pathog.* 8: 71-82.

- Piguet, V., Schwartz, O., Le Gall, S. and Trono, D. 1999. The downregulation of CD4 and MHC-I by primate lentiviruses: a paradigm for the modulation of cell surface receptors. *Immunol. Rev.* 168: 51-63
- Reitter, J., T. Sergel, and T. Morrison. 1995. Mutational analysis of the leucine zipper motif in the Newcastle disease virus fusion protein. *J. Virol.* 69: 5995–6004.
- Richardson, C.D., and P.W. Choppin. 1983. Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: studies on the site of action. *Virology* 131: 518-532.
- Rima, B.K., K. Baczko, D.T. Imagawa, and V. ter Meulen. 1987. Humoral immune response in dogs with old dog encephalitis and chronic distemper meningo-encephalitis. *J. Gen. Virol.* 68: 1723-1735.
- Rubinstein, E., F. Le Naour, M. Billard, M. Prenant, and C. Boucheix. 1994. CD9 antigen is an accessory subunit of the VLA integrin complexes. *Eur. J. Immunol.* 24: 3005-3013.
- Rubinstein, E., Poindessous-Jazat, V., Le Naour, F., Billard, M., and Boucheix, C. 1997. CD9, but not other tetraspans, associates with the β_1 integrin precursor. *Eur. J. Immunol.* 27, 1919-1927.
- Russell, R., R. G. Paterson, and R. A. Lamb. 1994. Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. *Virology* 199: 160–168.
- Schneider-Schaulies, J., J.-J. Schnorr, U. Brinckmann, L.M. Dunster, K. Baczko, U.G. Liebert, S. Schneider-Schaulies, and V. ter Meulen. 1995. Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild type and vaccine strains. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92: 3943-3947.
- Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J.-J., Schlender, J., Dunster, L. M., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. 1996. Receptor (CD46) Modulation and Complement-Mediated Lysis of Uninfected Cells after Contact with Measles Virus-Infected Cells. *J. Virol.* 70: 255-263.
- Schneider-Schaulies, S., Liebert, U.G., Baczko, K., and ter Meulen, V. 1990. Restricted expression of measles virus in primary rat astroglial cells. *Virology* 177:802-806.
- Seehafer, J.G., and A.R. Shaw. 1991. Evidence that the signal-initiating membrane protein CD9 is associated with small GTP-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 179: 401-406.
- Sergel, T., McGinnes, L.W., Peeples, M.E. und Morrison, T.G. 1993. The attachment function of the Newcastle disease virus hemagglutinin-neuraminidase protein can be separated from fusion promotion by mutation. *Virology* 193(2): 717-726
- Sergel-Germano, T., C. McQuain, and T. Morrison. 1994. Mutations in the fusion peptide and heptad repeat regions of the Newcastle disease virus fusion protein block fusion. *J. Virol.* 68: 7654–7658.
- Shaw, A.R.E., A. Domanska, A. Mak, A. Gilchrist, K. Dobler, L. Visser, S. Poppema, L. Fliegel, M. Letarte, and B.J. Willett. 1995. Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers β_1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.* 270:24092–24099.

- Signoret, N., Poignard, P., Blanc, D., Sattenau, Q. J. 1993. Human and simian immunodeficiency viruses: Virus-receptor interactions. *Trends Microbiol.* 1:328
- Slupsky, J.R., J.G. Seehafer, S.-C. Tang, A. Masellis-Smith, and A.R.E. Shaw. 1989. Evidence that monoclonal antibodies against CD9 antigen induce specific association between CD9 and the platelet glycoprotein IIb-IIIa complex. *J. Biol. Chem.* 264:12289–12293.
- Slupsky, J.R., J.G. Seehafer, S.C. Tang, A. Masellis-Smith, and A.R.E. Shaw. 1989. Evidence that monoclonal antibodies against CD9 antigen induce specific association between CD9 and the glycoprotein IIb-IIIa complex. *Biol. Chem.* 264: 12289-12293.
- Spagnoll, G. C., Ausiello, C., Palma, C., Bellone, G., Ippoliti, G., Letarte, M., and Malavasi, F., *Cell. Immunol.* 136, 208, 1991.
- Spear, P. G. 1993. Entry of alphaherpesviruses into cells. *Semin. Virol.* 4:167
- Spetz, A.L., B.K. Patterson, K. Lore, J. Andersson, and L. Holmgren. 1999. Functional gene transfer of HIV DNA by an HIV receptor-independent mechanism. *J. Immunol.* 163: 736-742.
- Spruce AE, Iwata A, Almers W. 1991. The first milliseconds of the pore formed by a fusogenic viral envelope protein during membrane fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 88: 3623–27.
- Spruce AE, Iwata A, White JM, Almers W. 1989. Patch clamp studies of single cell-fusion events mediated by a viral fusion protein. *Nature* 342: 555–58.
- Steinhauer DA, Wharton SA, Skehel JJ, Wiley DC. 1995. Studies of membrane fusion activities of fusion peptide mutants of influenza virus hemagglutinin. *J. Virol.* 69: 6643–51.
- Stern, L.B.-L., M. Greenberg, J.M. Gershoni, and S. Rozenblatt. 1995. The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *J. Virol.* 69: 1661-1668
- Stern, L.B.-L., M. Greenberg, J.M. Gershoni, and S. Rozenblatt. 1995. The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *J. Virol.* 69: 1661-1668.
- Stettler, M., Beck, K., Wagner, A., Vandevelde, M und Zurbriggen, A. 1997. Determinants of persistence in canine distemper viruses. *Vet. Microbiol.* 57: 83-93
- Summers, B.A., and M.J. Appel. 1994. Aspects of canine distemper virus and measles virus encephalomyelitis. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 20: 525-534.
- Tabata, N., M. Ido, S. Suga, S. Ohgimoto, M. Tsurudome, M. Kawano, M. Nishio, N. Watanabe, K. Okamoto, H. Komada, M. Sakurai, and Y. Ito. 1998. Protein tyrosine kinase activation provides an early and obligatory signal in anti-FRP-1/CD98/4F2 monoclonal antibody induced cell fusion mediated by HIV gp160. *Med. Microbiol. Immunol. Berl.* 186: 115-123.
- Tachibana, I. and Hemler, M.E. 1999. Role of Transmembrane 4 Superfamily (TM4SF) Proteins CD9 and CD81 in Muscle Cell Fusion and Myotube Maintenance. *J. Cell Biology* 146(4): 893–904.

- Tachibana, I., and M.E. Hemler. 1999. Role of transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins CD9 and CD81 in muscle cell fusion and myotube main-tenance. *J. Cell Biol.* 146:893–904.
- Tai, X.G., Y. Yashiro, R. Abe, K. Toyo-oka, C.R. Wood, J. Morris, A. Long, S. Ono, M. Kobayashi, T. Hamaoka, et al. 1996. A role for CD9 molecules in T cell activation. *J. Exp. Med.* 184:753–758.
- Tanabayashi, K., and R. W. Compans. 1996. Functional interaction of paramyxovirus glycoproteins: identification of a domain in Sendai virus HN which promotes cell fusion. *J. Virol.* 70: 6112–6118.
- Tanabayashi, K., K. Takeuchi, K. Okazaki, M. Hishiyama, and A. Yamada. 1992. Expression of mumps virus glycoproteins in mammalian cells from cloned cDNAs: both F and HN proteins are required for cell fusion. *Virology* 187: 801–804.
- Tanio, Y., H. Yamazaki, T. Kunisada, K. Miyake, and S.I. Hayashi. 1999. CD9 molecule expressed on stromal cells is involved in osteoclastogenesis. *Exp. Hematol.* 27: 853–859.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. and Yanagi, Y. 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* 406 (6798):893-897.
- Tedder T. F., V. S. Goldmacher, J. M. Lambert, S. M. Schlossmann 1986. Epstein-Barr virus binding induces internalization of the C3d receptor: a novel immunotoxin delivery system. *J. Immunol.* 137: 1387-1391.
- ter Meulen, V., Kreth, H.W. and Carter, M.J. 1982. Immunological aspects of slow virus infections of the nervous system. *Clinics in Immunology and Allergy* 2: 425-456.
- Tidona C., H. W. Kurz, H. Gelderblom, G. Darai 1998. Tupaja Paramyxovirus. Poster auf der Tagung der GfV in Regensburg.
- Tsurudome, M., Ito, M., Nishio, M., Kawano, Okamoto, K., Kusagawa, S., Komada, H. and Y. Ito. 1998. Identification of regions on the fusion protein of human parainfluenza virus type 2 which are required for hemagglutinin-neuraminidase proteins to promote cell fusion. *J. Gen. Virol.* 79: 379-289.
- Tsurudome, M., M. Kawano, T. Yuasa, N. Tabata, M. Nishino, H. Komada, and Y. Ito. 1995. Identification of regions on the hemagglutinin-neuraminidase protein of human parainfluenza virus type 2 important for promoting cell fusion. *Virology* 213: 190–203.
- Urbanska, E.M., B.J. Chambers, H.G. Ljunggren, E. Norrby, and K. Kristensson. 1997. Spread of measles virus through axonal pathways into limbic structures in the brain of TAP -/- mice. *J. Med. Virol.* 52: 362-369.
- Van Bogaert, L. and Innes, J.R.M. 1962. Subacute diffuse sclerosing encephalitis in the dog. In: *Comperative Neuropathology*. Ed. Innes and Saunders. Academic Press, New York. 394.
- Vandevelde, M., and A. Zurbriggen. 1995. The neurobiology of canine distemper virus infection. *Veterinary Microbiology* 44: 271-280.

- Visser, I. K. G., Kumarev, V. P., Orvell, C., De Vries, P., Broders, H. W. Uytdehaag, F. G. M. C. & Osterhaus, A. D. M. E. 1990. Comparison of two morbilliviruses isolated from seals during outbreaks of distemper in North West Europe and Siberia. *Archives of Virology* 111, 149-164.
- Vlasak, R., Luytjes, W., Spaa, W., and Palese, P. 1988. Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C virus. *PNAS*. 85:4526.
- Wells, R.G., Hediger, M. 1992. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:5596–5600
- Willett, B.J., M.J. Hosie, A. Shaw, and J.C. Neil. 1997. Inhibition of feline immunodeficiency virus infection by CD9 antibody operates after virus entry and is independent of virus tropism. *J. Gen. Virol.* 78: 611-618.
- Willett, B.J., M.J. Hosie, O. Jarrett, and J.C. Neil. 1994. Identification of a putative cellular receptor for feline immunodeficiency virus as the feline homologue of CD9. *Immunology* 81: 228-233.
- Williams ES, Thorne ET, Appel MJ and Belitsky DW. 1988 Canine distemper in black-footed ferrets (*Mustela nigripes*) from Wyoming. *J Wildl Dis.* Jul;24(3):385-98.
- Wisniewski, H., C.S. Raine, and W.J. Kay. 1972. Observations on viral demyelinating encephalomyelitis. Canine distemper. *Lab. Invest.* 26: 589-599.
- Yao, Q., and R. W. Compans. 1997. Association of the parainfluenza virus fusion and hemagglutinin-neuraminidase glycoproteins on cell surfaces. *J. Virol.* 71: 650-656.
- Yatomi, Y., M. Higashihara, Y. Ozaki, S. Kume, and K. Kurokawa. 1990. Intracellular ionized calcium mobilization of CD9 monoclonal antibody-activated human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Com.* 171: 109-115.
- Yatomi, Y., Y. Ozaki, K. Satoh, and S. Kume. 1993. Anti-CD9 monoclonal antibody elicits staurosporin inhibitable phosphatidyl 4,5-bisphosphate hydrolysis, phosphatidylinositol 3,4-bisphosphate synthesis, and protein-tyrosine phosphorylation in human platelets. *FEBS Lett.* 322: 285-290.
- Young, J.K., Li, D., Abramowitz, M.C., and Morrison, T.G. 1999. Interaction of peptides with sequences from the Newcastle disease virus fusionprotein heptad repeat regions. *J. Virol.* 73(7): 5945-56.
- Zimmerberg J, Blumenthal R, Sarkar DP, Curran, M., and Morris SJ. 1994. Restricted movement of lipid and aqueous dyes through pores formed by influenza hemagglutinin during cell fusion. *J. Cell Biol.* 127: 1885–94.
- Zurbriggen, A., H.U. Graber, A. Wagner, and M. Vandeveld. 1995. Canine distemper virus persistence in the nervous system is associated with noncytolytic selective virus spread. *J. Virol.* 69: 1678-1686.

8. Abkürzungen

μ	mikro
Abb.	Abbildung
AK	Antikörper
AS	Aminosäure
BME	β-Mercaptoethanol
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
CDV	Hundestaupevirus, Canine Distemper Virus
CPE	zytopathischer Effekt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach Infektion
Edm	Edmonston (MV-Vakzine)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
F	Fusionsprotein des CDV
FACS	fluorescence activated cell scanner; Durchflußzytometer
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat; Fluoreszenzfarbstoff
FKS	Fötales Kälberserum
FP	FACS-Puffer
g	Erdbeschleunigung
H	Hämagglutinationsprotein des CDV
h	Stunde
HA	Hämagglutination
HeLa-pA75/17-V	persistierend mit A75/17-V infizierte HeLa-Zellen
HeLa-pBUS	persistierend mit BUS infizierte HeLa-Zellen
HeLa-pDog/NI	persistierend mit pDog/NI infizierte HeLa-Zellen
HeLa-pOND	persistierend mit OND infizierte HeLa-Zellen
HeLa-pRB	persistierend mit RB infizierte HeLa-Zellen
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
hpi	Stunden nach Infektion
IF	Immunfluoreszenz
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
m	milli

M	Molar und M-Protein: Matrix
mAK	monoklonaler Antikörper
MEM	minimal essential medium
mfi	mittlere Fluoreszenzintensität
MG	Molekulargewicht
Min.	Minuten
MOI	multiplicity of infection; infektiöse Dosis
mRNA	messenger-RNA
n	nano
n. I.	nach Infektion
n.d.	not determined
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBMC	Periphere blood mononuclear cells (Periphere Blutmonozyten)
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PFA	Paraformaldehyd
PFU	plaque forming unit
POX	Peroxidase
RE	Restriktionsenzym
RNA	Ribonukleinsäure
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	RPMI 1640 Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	Reverse Transkriptions-Polymerase-Kettenreaktion
SSPE	Subakute sklerotisierende Panenzephalitis
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N-Tetramethyl-Ethylendiamin
TM	Transmembran(-Protein)
U	Units
Ü.N.	über Nacht
Vol.	Volumen
VOPBA	virus-overlay protein binding assay
ZNS	Zentrales Nervensystem

9. Lebenslauf

Erik Schmid

geboren am 6. Januar 1970 in Ichenhausen, Diplom-Biologe, verheiratet

Schule:

1976 – 1980	Grundschule in Ettenbeuren
1980 – 1989	Simpert-Kraemer-Gymnasium Krumbach

Studium:

11/1991 – 09/1996	Studium der Biologie an der Universität Würzburg
18. November 1993	Vordiplomsprüfung
25. September 1996	Diplomprüfung
	Hauptfach: Biotechnologie
	Nebenfächer: Zell- und Entwicklungsbiologie, Biochemie

Von Januar 1996 bis zum September 1996 Diplomarbeit im Institut für Biotechnologie der Universität Würzburg bei Herrn Prof. Dr. R. Benz:

"Charakterisierung des zuckerbindenden Porins OmpS aus *Vibrio cholerae* und der LamB-Substitutionsmutanten Y118S und R82S aus *E. coli* mit Hilfe der Stromfluktuationsanalyse"

Seit Februar 1997 Promotionsstudium am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg bei PD Dr. J. Schneider-Schaulies :

"Die Rolle des CD9 bei der CDV-Infektion"

Höchstadt, 29. Januar 2001

10. Veröffentlichungen

Publikationen

E. Schmid, A. Zurbriggen, U. Gassen, B. Rima, V. ter Meulen and J. Schneider-Schaulies, 2000. Antibodies to CD9, a tetraspan transmembrane protein, inhibits Canine Distemper Virus-induced cell-cell fusion but not virus-cell fusion. *J. Virol.* 74: 7554–7561.

Posterpräsentationen

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Regensburg vom 2. bis 5. März 1998.

Anti-CD9 Antikörper hemmen die Hundestaupevirus (CDV) Replikation in einem Schritt nach der Virusaufnahme

E. Schmid , S. Löffler, V. ter Meulen, J. Schneider-Schaulies

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Bremen vom 9. bis 12. März 1999.

CD9, ein Tetraspan-Transmembran-Protein, reguliert die durch das Hundestaupevirus (CDV) verursachte Zell-Zell-Fusion.

E. Schmid , A. Zurbriggen , U. Gassen , B. Rima , V. ter Meulen und J. Schneider-Schaulies

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Wien vom 9. bis 12. März 1999.

Antikörper gegen CD9 hemmen selektiv die durch das Hundestaupevirus (CDV) verursachte Zell-Zell-Fusion, aber nicht die Virus-Zell-Fusion.

E. Schmid , A. Zurbriggen , U. Gassen , B. Rima , V. ter Meulen und J. Schneider-Schaulies

XI. International Congress of Virology in Sydney am 9. August 1999.

CD9, a tetraspan transmembrane protein, regulates CDV-induced cell-cell-fusion.

E. Schmid , A. Zurbriggen , U. Gassen , B. Rima , V. ter Meulen und J. Schneider-Schaulies

Abschließend möchte ich mich herzlich bedanken bei:

- meinem Doktorvater, PD Dr. Jürgen Schneider-Schaulies, für die Betreuung meiner Arbeit, die angenehme Zusammenarbeit und dafür, dass er mir stets ein ansprechbarer Berater und Diskussionspartner war (und last but not least für das schnelle Korrekturlesen meiner Dissertation).
- Herrn Prof. Dr. G. Krohne für die Übernahme des Zweit-Gutachtens.
- Prof. Dr. B. Rima und seinen Mitarbeitern für die herzliche Betreuung und Zusammenarbeit während meines Aufenthalts in Belfast.
- Roman für seine Geduld bei der Beantwortung aller meiner Fragen zu Beginn meiner Doktorarbeit.
- Ruth für die stets anregenden Gespräche über Kosh und die Welt (und natürlich auch über virologische Themengebiete), sowie für die neusten Gerüchte aus der Kaffee-Ecke.
- Sigi Löffler für ihre Vorarbeit auf dem CDV-Gebiet und für die Vermittlung zahlreicher virologischer Methoden.
- meinen Kollegen /innen im Labor für die tolle Stimmung, das angenehme Arbeitsklima, die netten Diskussionen etc., usw. Insbesondere bedanke ich mich bei Franzi und Kerstin dafür, dass sie mich in meinem letzten Laborjahr vom Fluch des Plastikraums erlöst haben. Bei Christian bedanke ich mich, abgesehen von den streng wissenschaftlichen Gesprächen, für die anregenden „börsenspezifischen“ Diskussionen (und dafür, dass seine Transaktionen auch nicht viel ertragreicher als meine waren ;-). Olli danke ich für die harten Kämpfe um den Moorhuhn-Highscore (üben!) und dafür, dass er meine Meinung über medizinische Doktorarbeiten revidiert hat.
- Paul für die „softwaretechnische“ Unterstützung dieser Dissertation und für die Teilnahme an spätabendlichen „Dude-mäßigen“ Kinogängen.
- allen Teilnehmern des Dienstags-Seminars für Tips und Anregungen.
- der Bäckerei Schiffer und der Brauerei Wolf deren Erzeugnisse meinen Stoffwechsel während der jahrelangen Laborarbeit am Laufen hielten.
- den Firmen Apple und Microsoft, deren Produkte mich bei der Erstellung dieser Dissertation vor viele interessante und zeitintensive Probleme stellten und so mein „problemlösendes Denken“ schulten.
- meinen Eltern, ohne die diese Dissertation, rein biologisch betrachtet, nicht möglich gewesen wäre, für die stete moralische (und finanzielle) Unterstützung meines Studiums.

„... Tja, es gibt Tage, da verspeist Du den Bären und dann gibt es Tage da verspeist der Bär Dich. Verstehst Du was ich meine?“ (The Big Lebowski)

für Dani