

**Die Bedeutung des Masernvirus Matrix-Proteins  
für die Virusfreisetzung und zelltypabhängige Unterschiede  
seines intrazellulären Transports**

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

vorgelegt von

**Christine Lehmann  
geb. Pohl**

aus  
Münster/Westfalen

Würzburg, November 2006

Eingereicht am:

.....

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

.....

Gutachter :

.....

Gutachter:

.....

Tag des Promotionskolloquiums:

.....

Doktorurkunde ausgehändigt am:

.....

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig angefertigt und keine anderen als die genannten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass die vorliegende Dissertation weder in gleicher noch in ähnlicher Form in einem anderen Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

Christine Lehmann geb. Pohl

Würzburg, im November 2006

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b><u>Einleitung</u></b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Masernvirus</b>	<b>1</b>
1.1.1	Epidemiologie, Klinik und Pathogenese	1
1.1.2	Taxonomie und Struktur	3
1.1.3	Replikation und Transkription	7
<b>1.2</b>	<b>Virusmorphogenese und -knospung</b>	<b>10</b>
1.2.1	Beteiligung zellulärer Faktoren	10
1.2.2	Bedeutung von Matrix-Proteinen	12
1.2.3	Das MV M-Protein	13
<b>1.3</b>	<b>Dendritische Zellen</b>	<b>15</b>
<b>1.4</b>	<b>DCs in der Masernvirusinfektion</b>	<b>17</b>
<b>1.5</b>	<b>Ziele der Arbeit</b>	<b>19</b>
<b>2</b>	<b><u>Material</u></b>	<b>21</b>
<b>2.1</b>	<b>Zellen</b>	<b>21</b>
2.1.1	Zelllinien	21
2.1.2	Primäre Zellen	22
2.1.3	Bakterien	23
<b>2.2</b>	<b>Viren</b>	<b>23</b>
<b>2.3</b>	<b>Plasmide</b>	<b>23</b>
<b>2.4</b>	<b>Antikörper</b>	<b>24</b>
2.4.1	Unmodifizierte Primärantikörper und Seren	24
2.4.2	Modifizierte Primärantikörper	25
2.4.3	Sekundärantikörper und -reagenzien	26
<b>2.5</b>	<b>Zellkulturmedien und Zusätze</b>	<b>26</b>
2.5.1	Für eukaryotische Zellen	26
2.5.2	Für Bakterien	27

<b>2.6 Kits</b>	<b>27</b>
<b>2.7 Reagenzien, Puffer und Lösungen</b>	<b>28</b>
<b>2.8 Chemikalien</b>	<b>33</b>
<b>2.9 Verbrauchsmaterial</b>	<b>35</b>
<b>2.10 Geräte</b>	<b>35</b>
<b>2.11 Software</b>	<b>36</b>
<b><u>3 Methoden</u></b>	<b><u>37</u></b>
<b>3.1 Zellkultur</b>	<b>37</b>
3.1.1 Zellkultur adhärenter und semiadhärenter Zelllinien	37
3.1.2 Zellkultur von Suspensionszelllinien	37
3.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl	38
3.1.4 Kryokonservierung von Zellen	38
3.1.5 Mykoplasmentest	38
3.1.6 Isolierung humaner primärer mononukleärer Zellen aus einem Leukozytenkonzentrat	39
3.1.7 Isolierung primärer Monozyten und T-Zellen aus einem Leukozytenkonzentrat	40
3.1.8 <i>In-vitro</i> -Differenzierung humaner DCs aus Monozyten	42
<b>3.2 Virologische Methoden</b>	<b>43</b>
3.2.1 Herstellung von Viruspräparationen	43
3.2.2 Bestimmung des Virustiters	44
3.2.3 Infektion von adhärenenten und semiadhärenenten Zelllinien	45
3.2.4 Infektion von Suspensionszelllinien und DCs	45
<b>3.3 Molekularbiologische Methoden</b>	<b>46</b>
3.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien	46
3.3.2 Transformation von Bakterien	46
3.3.3 Präparation von Plasmid-DNA	47
3.3.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	47
3.3.5 Agarosegelelektrophorese	47

<b>3.4 Transfektionen</b>	<b>48</b>
3.4.1 Transiente Proteinexpression in 293-Zellen mit Saint-Mix- Transfektionsreagenz	48
3.4.2 Transiente Proteinexpression in HeLa-Zellen mit SuperFect®- Transfektionsreagenz	48
<b>3.5 Durchflusszytometrie</b>	<b>49</b>
3.5.1 Extrazelluläre Färbungen	49
3.5.2 Intrazelluläre Färbungen	49
<b>3.6 Mikroskopie</b>	<b>50</b>
3.6.1 Fluoreszenzmikroskopie	50
3.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie	52
3.6.3 Transmissionselektronenmikroskopie mit Immunlokalisation	52
<b>3.7 Proteinbiochemische Methoden</b>	<b>54</b>
3.7.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper	54
3.7.2 Herstellung von Zelllysaten	55
3.7.3 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration	55
3.7.4 Azeton-Präzipitation von Proteinen	55
3.7.5 Subzelluläre Fraktionierung mittels Optiprep®-Gradienten	56
3.7.6 Fraktionierung Detergenz-resistenter Membranfraktionen	56
3.7.7 <i>Virus-like particle</i> -Freisetzungstest	57
3.7.8 Co-Immunpräzipitation	57
3.7.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	58
3.7.10 Western Blot	59
<b>4 Ergebnisse</b>	<b>61</b>
<hr/>	
<b>4.1 Untersuchung zur Variabilität von M-Proteinen in MV Wildtyp- und Vakzinestämmen</b>	<b>61</b>
4.1.1 Transiente Expression und intrazelluläre Verteilung von M-Proteinen unterschiedlichen Ursprungs in transient M-Protein exprimierenden Zellen	61
4.1.2 Einfluss der Aminosäure an Position 89 auf die Antigenität in transfizierten Zellen	63

4.1.3	Antigenität von Wildtyp- und Vakzine-M-Proteinen in infizierten Zellen	65
<b>4.2</b>	<b>Eigenschaften des MV M-Proteins</b>	<b>67</b>
4.2.1	Die Fähigkeit von M-Proteinen zur Homooligomerisierung	67
4.2.2	Nachweis der posttranslationalen Ubiquitin-Modifikation des M-Proteins	68
4.2.3	Assoziation von MV-Proteinen mit Membranen unterschiedlicher Größe	70
4.2.4	Assoziation von MV-Proteinen mit Detergenz-resistenten Membranfraktionen	72
4.2.5	Die Fähigkeit von MV-Proteinen zur Freisetzung von <i>Virus-like particles</i> aus transfizierten Zellen	74
<b>4.3</b>	<b>Differentielle subzelluläre Verteilung von MV-Proteinen</b>	<b>81</b>
4.3.1	Subzelluläre Verteilung des MV M- und H-Proteins	82
4.3.2	Subzelluläre Verteilung des MV M- und N-Proteins	86
<b>4.4</b>	<b>Identifikation MV-Protein-enthaltender Zellkompartimente</b>	<b>91</b>
4.4.1	MV-Proteine sind nicht mit frühen Endosomen assoziiert	91
4.4.2	Assoziation des MV M-Proteins mit MVBs in HeLa-Zellen	92
4.4.3	Zelltypabhängige Assoziation von MV-Proteinen mit Lamp-1-positiven späten Endosomen	94
4.4.4	CD81-positive Kompartimente enthalten MV-Proteine in DCs	97
<b>5</b>	<b><u>Diskussion</u></b>	<b>101</b>
<b>6</b>	<b><u>Zusammenfassung</u></b>	<b>117</b>
<b>7</b>	<b><u>Summary</u></b>	<b>119</b>
<b>8</b>	<b><u>Literaturverzeichnis</u></b>	<b>121</b>

<b><u>9</u></b>	<b><u>Abkürzungsverzeichnis</u></b>	<b>134</b>
<b><u>10</u></b>	<b><u>Veröffentlichungen</u></b>	<b>137</b>
10.1	Publikationen	137
10.2	Vorträge	137
10.3	Posterpräsentationen	138
<b><u>11</u></b>	<b><u>Lebenslauf</u></b>	<b>139</b>



# 1 Einleitung

## 1.1 Das Masernvirus

Die akuten Masern sind eine hochansteckende Krankheit, die durch das Masernvirus (MV) hervorgerufen wird. Evolutionsgeschichtlich ist das Virus relativ jung. Es entstand vermutlich vor 4000 bis 5000 Jahren und könnte sich aus dem eng verwandten Rinderpestvirus in einem Umfeld, in dem Menschen und Rinder in räumlicher Nähe zueinander lebten, entwickelt haben (McNeill, 1976). Einziges natürliches Reservoir ist der Mensch, obwohl auch einige Primatenarten infiziert werden können. Die akute Infektion löst eine Immunantwort aus, die zu einer lebenslangen Immunität führt. Begleitet wird die Erkrankung von einer temporären generellen Immunsuppression (von Pirquet, 1908). Das Virus ist weltweit verbreitet, monoserotypisch und weist eine hohe antigene Stabilität auf. Die verschiedenen vorkommenden Genotypen gibt es zirkulieren weltweit oder sind ausgestorbenen und werden auf der Basis der Sequenzen des Hämagglutinin-Proteins (H) und des C-Terminus des Nukleokapsidproteins (N) definiert.

### 1.1.1 Epidemiologie, Klinik und Pathogenese

Die Masern gehören trotz der Verfügbarkeit eines wirksamen Lebendimpfstoffs immer noch zu den sechs häufigsten Todesursachen weltweit bei Kindern unter fünf Jahren insbesondere in wenig entwickelten Ländern. Die Mortalität beträgt dort 10 %. In der jüngeren Vergangenheit konnte die Zahl der Todesfälle durch massive Impfkampagnen von fast 900 000 1999 auf etwas mehr als 450 000 pro Jahr gesenkt werden (WHO, 2006). Die Mehrzahl der Erkrankungen tritt in Afrika auf, doch auch in Europa wird immer wieder über Ausbrüche der Krankheit berichtet.

Das Virus ist hochkontagiös, die Übertragung erfolgt durch Tröpfcheninfektion (Riley et al., 1978). Die Inkubationszeit beträgt etwa neun bis elf Tage. Die Infektion verläuft selten asymptomatisch oder subklinisch. Sie beginnt im

Respirationstrakt und breitet sich von dort über die Lunge zu den lokalen lymphatischen Organen aus. Schließlich disseminiert das Virus systemisch auf weitere lymphatische Organe und die Epi- und Endothelien z. B. der Haut, der Bindehäute, der Blase und der Leber. Die Ausbreitung geschieht vor allem zellassoziiert durch infizierte Monozyten und Lymphozyten (Esolen et al., 1993, Schneider-Schaulies et al., 1991). Es gibt kaum Hinweise für eine Plasmavirämie (Forthal et al., 1992).

Erste Symptome sind Husten, Schnupfen, Fieber und Bindehautentzündung. Etwa zeitgleich setzt das charakteristische Masernenanthem, die sogenannten Koplikschen Flecken, auf der Mundschleimhaut (Koplik, 1896) ein. Die Warthin-Finkeldeyschen Riesenzellen entstehen durch die Fusionsprotein (F)-vermittelte Fusion von Endothelzellen. Einige Tage später entwickelt sich das typische Exanthem. Es entsteht infolge der einsetzenden T-Zellantwort, ist eine allergische Reaktion und fehlt bei T-Zell-defizienten Patienten. Es beginnt hinter den Ohren und breitet sich dann weiter über das Gesicht und den gesamten Körper aus.

Die Immunantwort führt zur raschen Eliminierung des Virus. Zeitgleich mit der virusspezifischen Immunaktivierung wird in Patienten eine mehrwöchige Immunsuppression beobachtet. Sie ist die Hauptursache für die hohe Mortalität der Masern, da sie sekundäre Infektionen begünstigt. Deren Verlauf wird durch Mangelzustände wie Ernährungsmangel weiter verstärkt. Zu den Komplikationen gehören Diarrhoe, Otitis media und Pneumonien.

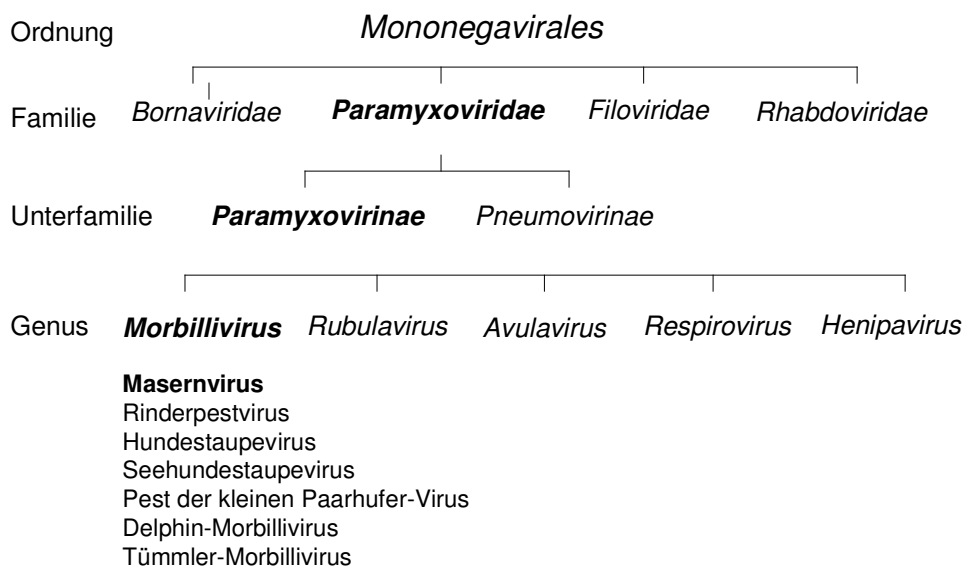
In Entwicklungsländern liegt der Prozentsatz der Erkrankten mit Komplikationen bei bis zu 80 % (Clements & Cutts, 1995), während dies bei 10 % der Patienten in industrialisierten Ländern der Fall ist.

Zu den schwersten Komplikationen gehören die durch das MV hervorgerufenen Enzephalitiden, von denen drei Formen bekannt sind: die akute postinfektiöse Enzephalitis (PIE), die Einschlusskörperchen-Enzephalitis (*measles inclusion body encephalitis*, MIBE) und die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE). Die PIE entwickelt sich gleichzeitig oder kurz nach Auftreten des Exanthems. Es ist kein Virus im Gehirn nachweisbar. 10 % der Fälle nehmen einen tödlichen Verlauf. Bei der MIBE und der SSPE findet in Zellen des

Gehirns Virusreplikation statt. Beide verlaufen tödlich und sind persistierende Infektionen (Connolly et al., 1967, Connolly et al., 1971). Die MIBE tritt innerhalb weniger Monate nur bei Personen mit T-Zell-Defekten auf. Eine Restriktion der viralen Genexpression ist zu beobachten und es wird kein infektiöses Virus produziert. Die SSPE tritt in einem von 10 000 Fällen etliche Jahre nach der akuten Infektion auf (Takasu et al., 2003). Begleitet sind die SSPE und MIBE von einer extrem hohen virusspezifischen humoralen Immunreaktion. Sequenzanalysen belegen, dass das virale Genom in SSPE und MIBE eine relativ hohe Frequenz von Mutationen, insbesondere innerhalb der Hüllprotein-kodierenden Gene, aufweist (Ayata et al., 1989, Baczko et al., 1993, Cattaneo et al., 1988, Furukawa et al., 2001, Rima & Duprex, 2005), während die Leseraster für die replikationsessentiellen Gene relativ konserviert sind. Im Einklang mit der Abwesenheit infektiöser Partikel lässt sich daraus schließen, dass ein Selektionsdruck für die zur Assemblierung viraler Partikel benötigten Genprodukte offenbar nicht besteht. Interessanterweise sind in nahezu allen Fällen die zytoplasmatische Domäne des Fusionsproteins und in unterschiedlichem Ausmaß das Leseraster des Matrix (M)-Protein-Gens von diesen Mutationen betroffen.

### 1.1.2 Taxonomie und Struktur

Das MV gehört zur Familie der *Paramyxoviridae*, die in die Ordnung *Mononegavirales* eingeordnet wird. Die Viren besitzen ein nicht-segmentiertes einzelsträngiges RNA-Genom von negativer Polarität. Die Anordnung ihrer Gene ist hochkonserviert, sie weisen Ähnlichkeiten in ihrer Replikationsstrategie auf. Die Familie *Paramyxoviridae* umfasst fünf Genera, wobei das MV dem Genus *Morbillivirus* angehört (vergl. Abb.1.1) Den Vertretern dieses Genus ist die fehlende Neuraminidaseaktivität gemeinsam.



**Abbildung 1.1: Taxonomische Gliederung der Ordnung *Mononegavirales*.**

Das MV besteht aus einer Lipidhülle, die den viralen Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex umgibt. Dieser setzt sich aus dem viralen Genom, assoziiert mit dem N-Protein und dem aus Phosphoprotein (P) und L-Protein (*large*) bestehenden Polymerasekomplex zusammen. Die Viruspartikel sind pleomorph und haben eine Größe von 120 bis 300 nm. Die Hüllmembran enthält die zwei Glykoproteine, das F-Protein und das H-Protein. Sie vermitteln den Eintritt des Virus in die Wirtszelle. Bislang sind zwei Rezeptoren bekannt, die von MV als Eintrittsrezeptoren benutzt werden: der Komplementbindungsrezeptor CD46 (*membrane cofactor protein, MCP*) (Dorig et al., 1993, Naniche et al., 1993) und CD150 (*signaling lymphocyte activation molecule, SLAM*) (Erlenhoefer et al., 2001, Hsu et al., 2001, Tatsuo et al., 2000). Dabei wird CD46, das ubiquitär auf allen kernhaltigen humanen Zellen vorkommt, nur von MV-Impfstämmen als Rezeptor genutzt. CD150 dient allen MV als Eintrittsrezeptor, also Wildtyp- und Impfstämmen, und wird auf aktivierten T-Zellen und B-Zellen, reifenden dendritischen Zellen (DCs) und Gedächtniszellen exprimiert (Cocks et al., 1995, Punnonen et al., 1997). Die Expression der Rezeptoren auf der Zelloberfläche wird nach Kontakt oder durch Infektion mit MV verringert (Erlenhoefer et al.,

2001, Schneider-Schaulies et al., 1995a). Das H-Protein, ein Typ-II-Transmembranprotein, ist für die Bindung an die zellulären Rezeptoren verantwortlich (Stern et al., 1995) und wirkt unterstützend bei der Fusion des Virus mit der Zellmembran (Nussbaum et al., 1995). Auf der Oberfläche infizierter Zellen und Viruspartikel liegt H als tetramerer Komplex bestehend aus zwei Dimeren vor, welche über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (Hu & Norrby, 1994). Die Dimerisierung erfolgt im endoplasmatischen Retikulum (ER) (Plempner et al., 2001).

Das F-Protein, ein Typ-I-Transmembranprotein, vermittelt hauptsächlich die Fusion von Virus- und Zellmembran nach der H-Protein-vermittelten Rezeptorbindung (Joshi et al., 1998, Samuel & Shai, 2001). Es wird als Vorläuferprotein  $F_0$  synthetisiert und anschließend im Golgi-Kompartiment durch eine Subtilisin-ähnliche Protease in seine aus den Untereinheiten  $F_1$  und  $F_2$  bestehende aktive Form prozessiert (Bolt et al., 1999, Sato et al., 1988). Auf der Oberfläche infizierter Zellen und viraler Partikel bilden Trimere des  $F_1/F_2$ -Heterodimers mit den H-Proteinen funktionelle Komplexe (Wild et al., 1994, Wild et al., 1991).

Die fusogene Aktivität des Komplexes wird durch die Assoziation beider Proteine mit dem M-Protein reguliert (Moll et al., 2001, Moll et al., 2002, Plempner et al., 2001). Neben dieser fusionsregulierenden wurde für das M-Protein eine transkriptionsregulierende Aktivität beschrieben und im Einklang damit findet sich das Protein in der infizierten Zelle sowohl in Assoziation mit dem Nukleokapsid als auch mit der Plasmamembran. Letzteres ist sicher auch für seine postulierte Bedeutung im Knospungsprozess relevant (siehe Abschnitt 1.2.3).

Das N-Protein ist das am stärksten exprimierte Protein des MV. Es enkapsidiert das RNA-Genom, ist phosphoryliert (Gombart et al., 1995) und bildet stabile Komplexe mit dem Phosphoprotein (P-Protein).

Das P-Protein ist Kofaktor der viralen Polymerase L, wirkt als Transkriptionsregulator, akkumuliert zu hohen Spiegeln in infizierten Zellen, wird aber nur in kleineren Mengen in Viruspartikel verpackt (Horikami & Moyer, 1995). Es ist ebenso wie das N-Protein phosphoryliert und hat die Fähigkeit zur Homotrimerisierung.

Von der mRNA des P-Gens werden auch das Nicht-Strukturprotein V und das C-Protein translatiert. Letzteres wurde in früheren Arbeiten ebenfalls den Nicht-Strukturproteinen zugeordnet, doch eine neuere Studie beschreibt, dass das C-Protein an der Partikelmorphogenese beteiligt ist und somit zu den Strukturproteinen gezählt werden könnte (Devaux & Cattaneo, 2004). Das V-Protein entsteht durch Editieren der mRNA durch Einfügen eines zusätzlichen G-Nukleotids. Der aminoternale Teil ist kolinear mit dem des P-Proteins, der Carboxyterminus divergiert infolge der Leserasterverschiebung, ist cysteinreich und zinkbindend (Cattaneo et al., 1989, Liston & Briedis, 1994). Das hochbasische C-Protein ist in einem anderen Leserahmen kodiert und entsteht durch Nutzung eines anderen Initiationscodons.

Beide Proteine könnten möglicherweise an der Transkriptionsregulation und Replikation in bestimmten Zelltypen beteiligt sein (Escoffier et al., 1999, Patterson et al., 2000, Tober et al., 1998, Valsamakis et al., 1998). Des Weiteren scheinen sie an der Inhibition der Interferon- $\alpha$ -Signalleitung beteiligt zu sein (Calain & Roux, 1993, Palosaari et al., 2003, Shaffer et al., 2003, Takeuchi et al., 2003). Tabelle 1.1-1 gibt eine Übersicht über alle MV-Proteine.

Tabelle 1-1: MV-Proteine: Größe und Eigenschaften

	Protein	Größe	Eigenschaften
Strukturproteine	N	60kDa	häufigstes MV-Protein bindet an genomische RNA
	P	72kDa	reguliert die Aktivität von L kleine Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase funktionelle Einheit mit L
	M	37kDa	Zusammenbau u. Freisetzung neuer Viruspartikel interagiert mit Nukleokapsid und Glykoproteinen
	F <sub>0</sub> F <sub>1</sub> /F <sub>2</sub>	60kDa 40kDa/22kDa	Membranfusion Trimer Typ-I-Glykoprotein Aktivierung durch proteolytische Spaltung des Vorläuferproteins im Komplex mit H in der Lipidhülle lokalisiert
	H	78kDa	Rezeptorbindung (Fusion) Tetramer Typ-II-Glykoprotein im Komplex mit F in der Lipidhülle lokalisiert
	L	220kDa	Transkription große Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase funktionelle Einheit mit P
Nicht-Strukturproteine	C	28kDa	Transkriptionsregulation? Replikationsregulation? translatiert von P-mRNA Störung der Typ-I-Interferon-Signalleitung Strukturprotein?
	V	45kDa	Transkriptionsregulation gebildet durch Editieren der P-mRNA im Komplex mit N organisiert Störung der Typ-I-Interferon-Signalleitung

### 1.1.3 Replikation und Transkription

Das MV-Genom besitzt eine Länge von ca. 16 Kilobasen (kb) und besteht aus einem kontinuierlichen RNA-Molekül mit negativer Orientierung, das in dichter Packung mit dem N-Protein vorliegt. Dabei bindet je ein N-Protein sechs Nukleotide des Genoms. Nur Viren mit einer Genomlänge, die einem Vielfachen von sechs entsprechen sind replikationsfähig. Dies wird als *Rule of six* bezeichnet (Calain & Roux, 1993). Das Genom kodiert für sechs kontinuierliche Transkriptionseinheiten, die abgesehen von dem Bereich zwischen M- und F-Gen

durch kurze intergenische Sequenzen voneinander getrennt sind, welche die Information für die Termination der Transkription, Polyadenylierung und Reinitiation der Transkription enthalten (Bellini et al., 1994). Das Genom wird von sogenannten nicht-codierenden 3'-Leader- und 5'-Trailer-Sequenzen flankiert. Sie enthalten Informationen für die Verpackung in Viruspartikel und die viralen Promotoren für die Transkription und Replikation der genomischen und antigenomischen RNA (Horikami & Moyer, 1995) (Abb.1.2).

Replikation und Transkription des Genoms finden im Zytoplasma der Wirtszelle statt. Dorthin gelangt das Virus nach der Interaktion mit den auf der Oberfläche der Zellen vorhandenen Rezeptoren und der Fusion mit der Zytoplasmamembran. Nach dem Eintritt in die Zelle initiiert die RNA-abhängige RNA-Polymerase die Primärtranskription des N-Gens infolge Bindung an den Promotor innerhalb der 3'-Leader-Sequenz (Crowley et al., 1988). Wenn das Ende des Gens erreicht ist, wird das gebildete mRNA-Transkript mit einer Cap-Struktur versehen und polyadenyliert. An der folgenden Initiationssequenz des P-Gens startet die Transkription erneut. Dieser Vorgang von Transkriptionsinitiation, Überlesen der intergenischen Sequenzen und Reinitiation wiederholt sich vor dem M-, F- und H-Gen. Jedes Mal, wenn die intergenischen Sequenzen übersprungen werden, kann es zum Abfallen des Polymerasekomplexes von der RNA-Matrize kommen. Je weiter das Gen von der 3'-Leader-Sequenz entfernt liegt, desto weniger häufig wird es abgelesen. Dies hat zur Folge, dass ein Gradient in der Menge der gebildeten mRNAs entsteht, der sich auch auf der Ebene der synthetisierten Proteine widerspiegelt (Cattaneo et al., 1987a, Harder & Osterhaus, 1997, Schneider-Schaulies et al., 1989).

Vermutlich wird der Wechsel von der Transkription zur Replikation über die in der infizierten Zelle vorliegende Menge an N-Protein reguliert. Im Replikationsmodus werden die internen Terminationssignale überlesen, was zur Entstehung positivsträngiger Genom-Intermediate führt (Banerjee, 1987, Blumberg & Kolakofsky, 1981, Lamb, 1996), die als Matrizen für die Synthese neuer negativsträngiger Genome fungieren. Die Replikation ist strikt an die Kondensation der naszierenden RNA mit N-Proteinen und damit die Bildung von



N-RNA-Komplexen gekoppelt, die, nach Assoziation mit P- und L-Proteinen, auf noch nicht im Detail verstandene Weise an die Plasmamembran translozieren. Vielleicht kommt es zu einer Interaktion mit zellulärem Aktin und Mikrotubuli (Bohn et al., 1986, Moyer et al., 1990). Die Knospung erfolgt hierbei vorzugsweise von speziellen Membranmikrodomänen, sogenannten Detergenz-resistenten Membranmikrodomänen (DRMs), die auch als *Lipid Rafts* bezeichnet werden (Manie et al., 2000, Vincent et al., 2000).

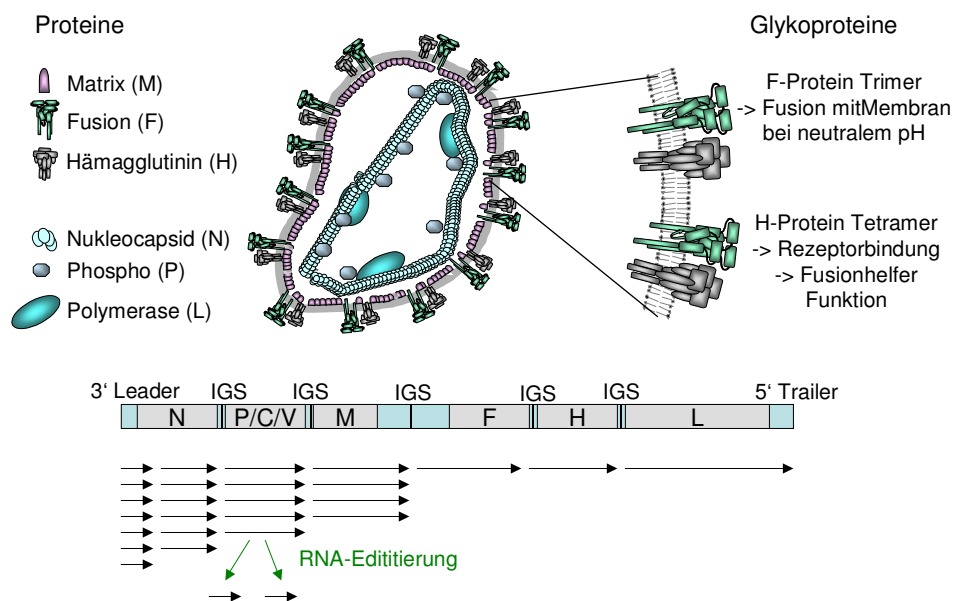


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der MV-Genomorganisation und des MV-Partikels.

## 1.2 Virusmorphogenese und -knospung

### 1.2.1 Beteiligung zellulärer Faktoren

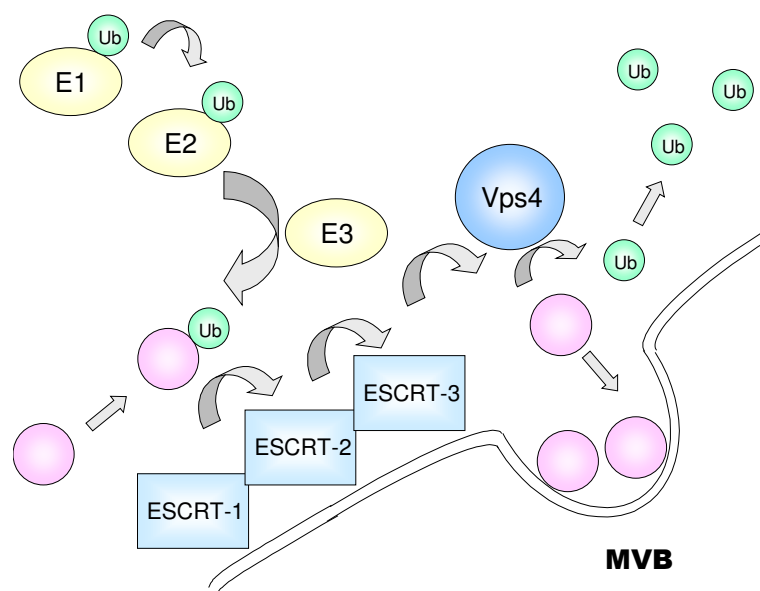
Der endosomalen Sortiermaschinerie kommt eine wesentliche Rolle im Transport viraler Proteine zu (Kolesnikova et al., 2004a, Kolesnikova et al., 2002). Dazu gehören insbesondere multivesikuläre Körperchen (*multivesicular bodies*, MVBs), die zu den späten Endosomen gehören. MVBs sind die Sortierungskompartimente, von denen aus Proteine entweder zum proteolytischen Abbau in Lysosomen transportiert oder an die Zelloberfläche zurücktransferiert werden. Dieser Rücktransport wird als retrograder Transport bezeichnet und es konnte gezeigt werden.

Die Erkennung der „Proteinfracht“ erfolgt oft über posttranslationale Mono-Ubiquitin-Modifikationen. Anders als die Poly-Ubiquitinierung markiert sie Proteine nicht zum Abbau in Proteasomen. Durch die Mono-Ubiquitinierung werden sogenannte ESCRT (*endosomal complex required for transport*)-Komplexe rekrutiert (siehe Abb. 1.3). ESCRT-Komplexe sind Multiproteinkomplexe, die mit MVBs assoziiert und an der endosomalen Proteinsortierung beteiligt sind, indem sie für den Transport bestimmte Proteine binden. Sie helfen in zellulären Prozessen bei der Abschnürung von Vesikeln in das Lumen der MVBs. Signale für die Sortierung von Proteinen auf der endosomalen Route können linear sein und aus Tyrosin- oder Di-Leucin-Motiven bestehen oder nicht-linear sein (Katzmann et al., 2001, Kil et al., 1999, Marks et al., 1996, Reggiori & Pelham, 2001). Die Modifikation mit Ubiquitin ist das häufigste der nicht-linearen Signale. Sie erfolgt durch Klasse-E-Faktoren (E1-E3-Ubiquitinligasen). Am Ende der zum Teil unterschiedlichen Kaskaden der Proteinsortierung steht Vps4, eine AAA-Typ-ATPase, die im retroviralen Knospungsprozess benötigt wird (Gottwein et al., 2003, Martin-Serrano et al., 2003, Shehu-Xhilaga et al., 2004, Strack et al., 2003).

Topologisch entspricht der virale Knospungsprozess dem von Vesikeln in MVBs und die an der Abschnürung von Vesikeln in das Lumen der MVBs beteiligten zellulären Proteine, fördern in gleicher Weise die Bildung von Viruspartikeln.

So konnte für verschiedene virale M- und Gag-Proteine eine Ubiquitin-Modifikation als essentiell für die Freisetzung nachgewiesen werden (Spidel et al., 2004).

Zudem enthalten virale M-Proteine konservierte Motive, die die Rekrutierung einzelner Komponenten der endosomalen Transportmaschinerie, die auch als *vacuolar protein sorting*-Proteine (Vps) bezeichnet werden (u. a. ESCRT-Komplexe, Klasse-E-Vps-Proteine), vermitteln und diese an den Ort der Knospung dirigieren, was möglicherweise zelltypspezifisch ist (Garcia et al., 2005, Pelchen-Matthews et al., 2003). Solche Sequenzmotive werden als L (late)-Domänen bezeichnet und sind wichtig für späte Prozesse in der Partikelbildung. Gegenwärtig sind vier verschiedene Motiv-Typen bekannt: PT/SAP, PPXY, YXXL und FPIV (Freed, 2002, Schmitt et al., 2005). Tsg101, das Teil des ESCRT-I-Komplexes ist, interagiert mit dem PT/SAP-Motiv. YXXL-Motive binden an AIP-1/ALIX, das mit Komponenten des ESCRT-III-Komplexes interagiert. Viren, in deren M-Proteinen diese Motive deletiert oder zerstört wurden, haben einen Defekt in der finalen Abschnürung der Partikel (Craven et al., 1999, Freed, 2002, Jayakar et al., 2000).



**Abbildung 1.3:** Schematische Darstellung der Mono-Ubiquitinierung von Proteinen mit anschließender Sortierung in MVBs.

### 1.2.2 Bedeutung von Matrix-Proteinen

Die M-Proteine der Vertreter der *Mononegavirales* sind essentiell für späte Schritte im viralen Lebenszyklus, insbesondere die Knospung und Partikelmorphogenese. M-Proteine assoziieren sehr stark mit Membranen, ohne dass bekannt ist, worauf dies beruht. Sie sind keine Transmembranproteine, obwohl die Stärke der Membranbindung vergleichbar ist. Posttranslationale Modifikationen, die für die Bindung von Proteinen an Membranen verantwortlich sind, wie Fettsäuremodifikationen (Myristoylierung, Palmitoylierung) konnten bei ihnen, anders als beim Gag-Protein von Retroviren bisher nicht nachgewiesen werden (Bryant & Ratner, 1990, Gottlinger et al., 1989, Pal et al., 1990). Für funktionelle Orthologe der Mitglieder dieser Ordnung, insbesondere das M-Protein der *Filoviridae* (VP40) wurde die Membranbindung im Detail untersucht. Es assoziiert früh nach der Synthese mit kleinen Membranvesikeln und nachfolgend mit Lamp-1-positiven endosomalen Membranen. Es wird über den sogenannten retrograden endosomalen Transportweg zum Knospungsort, der Zytoplasmamembran, transportiert (siehe Abschnitt 1.2.1) (Kolesnikova et al., 2004a, Kolesnikova et al., 2004b, Kolesnikova et al., 2002). Dies sind vorwiegend DRMs in die VP40 rekrutiert wird. Das ist insbesondere in infizierten oder transfizierten VP40-exprimierenden Zellen bei Koexpression des Ebolavirus-Glykoproteins der Fall. VP40 katalysiert die Freisetzung viraler Partikel (in infizierten Zellen) oder sogenannter *virus-like particles* (VLPs) (Bonifacino & Traub, 2003). VLPs sind membranumhüllte Partikel, die sich wie Viruspartikel von der Plasmamembran abschnüren. Die Morphologie und Partikelgröße werden vom M-Protein determiniert. Hierfür kann das M-Protein allein ausreichen, wie dies z. B. für die M-Proteine des Sendavirus, humanen Parainfluenzavirus, Lassavirus und des Virus der vesikulären Stomatitis (VSV), aber auch für das Gag-Protein des humanen Immundefizienzvirus-1 beschrieben wurde (Justice et al., 1995, Schmitt et al., 2002, Strecker et al., 2003, Takimoto & Portner, 2004). In einigen Fällen führt eine Koexpression der Glykoproteine zu einer Verstärkung der VLP-Produktion (Licata et al., 2004, Panchal et al., 2003).

Es wurde weiterhin beschrieben, dass VP40 Oktamere formt, die selektiv RNA inkorporieren (Gomis-Ruth et al., 2003). Diese sind für die Assoziation mit DRMs, die Bildung von Viruspartikeln und VLPs sowie die Interaktion der L-Domäne vom PPXL-Typ mit dem zellulären Nedd4, nicht jedoch Tsg101, wichtig (siehe Abschnitt 1.2.1) (Gomis-Ruth et al., 2003, Panchal et al., 2003, Timmins et al., 2004, Timmins et al., 2003).

Eine Mono-Ubiquitinierung von Proteinen stellt ein Sortierungssignal für den endosomalen Weg und damit verbunden für die Interaktion mit zellulären Faktoren dar und erfolgt durch das zelluläre E1-E3-Konjugationssystem (siehe Abb.1.3). Sie wurde für retrovirale Gag-Proteine und paramyxovirale M-Proteine nachgewiesen (Harty et al., 2001, Patnaik et al., 2000).

In den M-Proteinen von Rhabdo- und Filoviren sowie in den Gag-Proteinen vieler Retroviren wurden außerdem sogenannte L-Domänen beschrieben, die die Interaktion mit zellulären Proteinen vermitteln und essentiell für die Partikelabschnürung von der Zellmembran sind (siehe Abschnitt 1.2.1). Diese befinden sich häufig benachbart zu den Sequenzen, die ubiquitiniert werden, sind aber nicht mit ihnen identisch.

### 1.2.3 Das MV M-Protein

Das M-Protein ist ein peripheres Membranprotein, das sowohl mit der inneren Plasmamembran infizierter Zellen als auch mit dem Nukleoproteinkomplex assoziiert ist und mit den zytoplasmatischen Anteilen des F-Proteins interagiert (Bellini et al., 1994, Cathomen et al., 1998b, Griffin & Bellini, 1996, Moll et al., 2002, Naim et al., 2000). Es ist für die Freisetzung neu gebildeter Viruspartikel von Bedeutung und wirkt als negativer Transkriptionsregulator (Cathomen et al., 1998a, Suryanarayana et al., 1994). Posttranslationale Modifikationen wie Lipidanker (Myristoylierung oder Palmitoylierung) wurden bisher nicht beschrieben.

Das M-Protein des MV ist basisch und in seiner Aminosäuresequenz hoch konserviert. Wildtyp-M-Proteine zeigen in SDS-Polyacrylamid-Gelen eine geringere Mobilität als die der Vakzinestämme (39 kDa statt 37 kDa), was auf

strukturelle Unterschiede schließen lässt, die durch eine unterschiedliche Aminosäuresequenz verursacht werden (Rima et al., 1995b, Rima et al., 1979, Rima & Martin, 1976). Einige der Unterschiede in der Aminosäuresequenz zwischen attenuierten Stämmen und Wildtypstämmen sind konserviert (u. a. an Position 64, 89 und 209). Für die Aminosäure an Position 89 ist bekannt, dass sie zur Adaption des Viruswachstums in der Zelllinie Vero beiträgt (Tahara et al., 2005).

In persistierenden Infektionen des zentralen Nervensystems finden sich häufig M-Proteine mit einer großen Anzahl an Mutationen, was den beobachteten Defekt in der Partikelbildung erklären könnte (Schneider-Schaulies & Liebert, 1991). Dies und die Tatsache, dass ein rekombinantes MV, in dem das M-Gen deletiert wurde, sich nur schlecht repliziert und vorwiegend zellassoziiert vorliegt, gelten als Evidenz für die große Bedeutung des M-Proteins in der Partikelmorphogenese (Cathomen et al., 1998a).

Das M-Protein assoziiert in infizierten Zellen mit *Lipid Rafts*, die zu den DRMs gehören und als Plattform für den Zusammenbau neuer Viruspartikel und Knospungsort betrachtet werden (Manie et al., 2000). In einer anderen Arbeit konnte in HeLa-Zellen unter Verwendung eines Vaccinia-basierten Expressionssystems die Assoziation eines Fünftels der Gesamtmenge des Proteins mit *Lipid Rafts* nachgewiesen werden (Vincent et al., 2000). Es scheint, dass die Assoziation des M-Proteins mit Membranen und der intrazelluläre Transport unabhängig von dem anderer viraler Bestandteile stattfindet (Riedl et al., 2002). Die Virusfreisetzung kann jedoch auch an anderen Orten der Membran und auch ohne Inkorporation des M-Proteins erfolgen, wie mit einem rekombinanten MV, das Glykoprotein G des VSV anstelle von F und H exprimiert, gezeigt wurde. Für das VSV-G-Protein ist bekannt, dass es nicht *Lipid-Raft*-ständig ist (Spielhofer et al., 1998). Interessanterweise erscheint die Knospung nicht vollständig von dem M-Protein abzuhängen, da auch von Zellen, die mit dem M-Protein-losen MV infiziert waren, infektiöse Partikel produziert wurden. Dies geschieht nur äußerst ineffizient und in geringem Ausmaß (Cathomen et al., 1998a). Diese Studien unterstreichen die postulierte Bedeutung des M-Proteins im Knospungsprozess.

Für das MV-M-Protein wurde bisher nicht untersucht, ob es wie seine funktionellen Orthologe auch die Bildung von VLPs ermöglicht oder die Fähigkeit zur Oligomerisierung besitzt. Es ist auch unbekannt, ob es über die endosomale Route transportiert wird und eine Mono-Ubiquitin-Modifikation aufweist. In der Sequenz des MV-M-Proteins kommen zwei L-Domänen-Motive vor. Sie sind vom YXXL-Typ (52 YMFL 56) und PT/SAP-Typ (311 PSVP 314). Ihre Funktionalität ist bisher nicht erwiesen.

### 1.3 Dendritische Zellen

DCs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (*professional antigen presenting cells*, APCs). Es lassen sich verschiedene Subtypen unterscheiden. Man unterscheidet plasmazytoide und myeloide DCs. Ihre Frequenz im peripheren Blut ist sehr gering, daher werden für *In-vitro*-Experimente in der Regel Vorläuferzellen (Monozyten) verwendet, die in Kultur durch Zugabe bestimmter Wachstumsfaktoren und Zytokine zu DCs differenziert werden.

Im Folgenden werden lediglich myeloide DCs behandelt. Sie ändern im Zuge der Ausreifung ihre Lokalisation im Körper und nehmen abhängig von ihrem Reifungsgrad unterschiedliche Aufgaben wahr. Unreife DCs sind in den peripheren Geweben des Körpers lokalisiert. Ihr Rezeptorrepertoire ist auf die Aufnahme von Antigenen spezialisiert. Ihre endozytotische und makropinozytotische Aktivität ist extrem hoch. Bei einer Infektion durch eindringende Pathogene werden deren Antigene von den DCs in der Peripherie des Körpers (Haut oder Schleimhäute) aufgenommen und prozessiert (Banchereau & Steinman, 1998). Die Aktivierung der DCs erfolgt durch *pattern-recognition*-Rezeptoren (PRR) (Janeway, 1992) wie Toll-ähnliche Rezeptoren (*toll-like-receptors*, TLR) (Janeway & Medzhitov, 2002) und C-Typ-Lektin-Rezeptoren wie DC-SIGN (*dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM-3) grabbing non-integrin*, CD209)(Geijtenbeek *et al.*, 2000) und DEC205 (Jiang *et al.*, 1995), aber auch durch Fc $\gamma$ - und Fc $\epsilon$ -Rezeptoren (Sallusto & Lanzavecchia, 1994) und CD40-Ligation (Cella *et al.*, 1996) sowie generelle inflammatorische Signale. Unreife DCs exprimieren wenig MHC (*major histocompatibility*

*complex*, MHC)-II und kostimulatorische Moleküle wie CD80, CD86 und CD40 auf der Oberfläche (Banchereau & Steinman, 1998).

Die Antigenaufnahme verändert stark Funktion und Morphologie sowie die Expression der Oberflächenrezeptoren. Mit beginnender Reifung wandern die DCs chemotaktisch aus der Peripherie in die lymphatischen Organe, wo sie die aufgenommenen und prozessierten Antigene T-Zellen präsentieren. Reife DCs verlieren die Fähigkeit, Antigene aufzunehmen, die Expression der Fc-Rezeptoren geht zurück. Die Expression anderer Oberflächenmoleküle, die für die Kostimulation und die Antigenpräsentation von Bedeutung sind, wird dagegen erhöht. Dazu gehören beispielsweise CD80 und CD86, MHC-I und MHC-II sowie Adhäsionsmoleküle (LFA-1,  $\beta$ 2-Integrine, L-Selectin) (Robert et al., 1999). Proinflammatorische Zytokine wie IL-6, IL-8, IL-12, IL-18 und Chemokine, welche eine Entzündungsreaktion hervorrufen und die Invasion weiterer Zellen, bewirken werden produziert.

Auch in DCs, die besonders reich an Sortiermaschinen sind, werden Proteine wie Rezeptormoleküle von der Zelloberfläche internalisiert, dem endosomalen Transportweg zugeführt, sortiert und an ihre Bestimmungsorte transportiert (Dascher et al., 2002).

Zu den an diesen Prozessen beteiligten Organellen gehören die MVBs, die Teil des pleomorphen endosomalen Systems sind, das aus frühen Endosomen, späten Endosomen und proteolytisch aktiven Lysosomen besteht (Katzmann et al., 2002, Miller et al., 2002).

In DCs bewirkt die Reifung einen Wechsel von starker endozytotischer Aktivität, die der Aufnahme von Antigenen dient, zu Mechanismen der Antigenpräsentation und damit zusammenhängend dem längeren Verbleiben von peptidbeladenen MHC-Komplexen auf der Zelloberfläche. Zusätzlich zu den klassischen endosomalen Kompartimenten besitzen DCs weitere spezielle MVB-Kompartimente, die auf die MHC-abhängige Antigenpräsentation spezialisiert sind. Zu ihnen gehören MHC-reiche Kompartimente, sogenannte MIIcs und Klasse-II-haltige Vesikel (*class II containing vesicles*, CIIVs) (Barois et al., 2002). Sie unterscheiden sich in ihrer Proteinausstattung von hoch Lamp-1-positiven späten Endosomen. Stattdessen sind sie durch das Vorkommen



von Tetraspaninen wie CD81, CD82 und CD9 gekennzeichnet. Im Zuge der Ausreifung der DCs tubulieren die MIICs und der damit verbundene Rücktransport der MHC-II-Moleküle an die Zelloberfläche stellt einen retrograden Transport integraler Membranproteine zur Zelloberfläche dar (Gatti & Pierre, 2003, Murk et al., 2002).

Als eine weitere Besonderheit können in DCs neu synthetisierte Proteine in sogenannten DC-Aggresom-ähnlichen-induzierten Strukturen (*DC aggresome-like structures*, DALIS) akkumulieren (Lelouard et al., 2004). DALIS entstehen während der DC-Ausreifung und unterscheiden sich von Aggresomen u. a. in ihrer zellulären Lokalisation, ihrer Unabhängigkeit vom Mikrotubuli-organisierenden Zentrum und ihrer transienten Natur. Sie enthalten E1-E3-Proteine des Ubiquitin-Konjugationssystems und ihre Entstehung ist durch die proteasomale Aktivität gesteuert. Auf diese Weise scheinen DCs in der Lage zu sein, die Degradation bestimmter ubiquitiniertes Proteine für die Antigenpräsentation zu regulieren.

#### 1.4 DCs in der Masernvirusinfektion

Kulturmodelle zeigen, dass DCs mit Vakzine- und Wildtypstämmen des MV infizierbar sind, weil sie die beiden zellulären Rezeptoren CD46 und CD150 exprimieren oder im Zuge ihrer Ausreifung induzieren (Fugier-Vivier et al., 1997, Grosjean et al., 1997, Klagge et al., 2000, Ohgimoto et al., 2001). Bei einer korrekten Ausreifung der DCs und Einwanderung in lymphatische Gewebe kommt es zu einer erfolgreichen Aktivierung von T-Zellen. Sobald die in Abschnitt 1.3 beschriebenen Prozesse nicht vollständig oder verändert ablaufen, kann eine Immunsuppression wie sie bei der MV-Infektion beobachtet wird, die Folge sein.

Reife DCs exprimieren *in vitro* und *in vivo* CD150 auf ihrer Oberfläche, während unreife DCs *in vivo* zwar CD46 exprimieren, CD150 allerdings erst im Zuge der Ausreifung, zum Beispiel durch LPS-Stimulation oder Ligation von CD40, induziert wird (Bleharski et al., 2001). Bei *in vitro* aus Monozyten generierten DCs konnte CD150 in kleinen Mengen bereits auf unreifen DCs nachgewiesen

werden (Ohgimoto et al., 2001). Die MV-Infektion selbst kann die Expression von CD150 induzieren (Bieback et al., 2002). DC-SIGN hat einen verstärkenden Effekt auf die MV-Infektion, insbesondere von unreifen DCs, auch wenn es kein Eintrittsrezeptor ist (de Witte et al., 2006).

Die Infektion unreifer DCs induziert deren phänotypische Ausreifung, was sich in einer erhöhten Expression von Aktivierungs- und Reifungsmarkern, wie MHC II, CD40, CD80, CD86 sowie CD83 und CD25 auf der Oberfläche manifestiert (Klagge et al., 2000, Servet-Delprat et al., 2000). Die Infektion mit dem Vakzinestamm Edmonston (ED) verläuft ineffizienter und induziert eine langsamere Ausreifung als die Infektion mit dem Wildtypvirus (WTF) (Wildtyp Fleckenstein) (Schnorr et al., 1997).

DCs replizieren das Virus, wie die Akkumulation von internen und Glykoproteinen auf der Zelloberfläche zeigt. Allerdings unterliegt die Infektion von DCs Restriktionen, da sie nur wenig bis kein infektiöses Virus produzieren (Fugier-Vivier et al., 1997, Servet-Delprat et al., 2000). Durch die Ligation von CD40 auf der Oberfläche kann die Replikation und Produktion von infektiösem Virus jedoch gesteigert werden (Fugier-Vivier et al., 1997, Servet-Delprat et al., 2000).

Die Replikation unterscheidet sich damit möglicherweise fundamental für APCs und andere Zelltypen wie z. B. Fibroblasten. Die fehlende oder geringe Partikelproduktion in DCs könnte auf einen Defekt in einem späten Schritt der Virusfreisetzung wie der Partikelmorphogenese oder der Virusfreisetzung hindeuten. DCs sind somit semipermissiv gegenüber MV. Auch in Monozyten ist die Virusfreisetzung reifungsabhängig beschränkt, was wiederum nicht mit der Proteinsynthese zusammenhängt (Helin et al., 1999). Ursache könnte ein veränderter Transport oder eine unterschiedliche Sortierung der viralen Proteine sein, die für den Partikelzusammenbau und die Knospung relevant sind. Dass dies in zuvor mit LPS-ausgereiften DCs besonders ausgeprägt ist, könnte mit ihrer zellulären Ausreifung zusammenhängen. In reifen DCs sind die endosomalen Transportwege verändert und könnten eine ineffiziente Partikelmorphogenese bedingen (siehe Abschnitt 1.3). Auch für andere Viren, wie Sendaivirus oder Herpes-Simplex-Virus, wurden zelltypabhängige Restriktionen der Infektion

gezeigt, so dass es sich dabei um einen generellen Mechanismus handeln könnte, der insbesondere in DCs eine Infektion nach Antigenen scannender T-Zellen verhindern würde (McWilliam et al., 1997, Samady et al., 2003).

## 1.5 Ziele der Arbeit

Die Infektion von DCs mit MV führt nur zu einer äußerst ineffizienten Produktion von MV-Partikeln, wie in vorangegangenen Arbeiten beschrieben wurde. Es wird angenommen, dass einen Defekt in einem späten Schritt des viralen Lebenszyklus die Ursache hierfür ist, da alle viralen Proteine *de novo* synthetisiert werden. Späte Prozesse der Virusmorphogenese werden entscheidend durch M-Proteine definiert. Dies konnte bereits für orthologe M-Proteine anderer negativsträngiger RNA-Viren gezeigt werden. Auch das MV M-Protein gilt als wichtig für die Virusfreisetzung.

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, die Bedeutung des MV M-Proteins für die Partikelproduktion zu untersuchen. Dabei galt es zu verstehen, welche zelltypspezifischen Unterschiede zwischen den produktiv infizierbaren Fibroblastenzelllinien 293 bzw. HeLa einerseits und den semipermissiven DCs andererseits vorliegen und welchen Einfluss das M-Protein auf die fehlende Partikelproduktion in DCs hat.

Ein Vergleich der Situation in Fibroblasten und DCs ist erst möglich, wenn die Rolle des M-Proteins im Prozess der Partikelfreisetzung in den Fibroblastenzelllinien besser verstanden wird. Daher sollten in permissiven Fibroblastenzelllinien bestimmte Eigenschaften des M-Proteins untersucht werden. Dabei galt das Interesse der Assoziation des Proteins mit Membranen, insbesondere den DRMs. Außerdem sollte die Fähigkeit zur Produktion von VLPs sowie der Einfluss der Glykoproteine auf die DRM-Assoziation und VLP-Freisetzung aufgeklärt werden. Weiterhin wurden potenzielle Unterschiede zwischen dem Vakzinestamm M(ED) und dem Wildtypstamm M(WTF) studiert. Für orthologe M-Proteine konnte eine posttranslationale Ubiquitin-Modifikation nachgewiesen werden, die als Signal für die endosomale Proteinsortierung fungiert. Ob eine

solche auch beim M-Protein des MV vorkommt, war ebenfalls Gegenstand der Untersuchung.

In der vorliegenden Arbeit wurde zudem untersucht, ob es Unterschiede in der intrazellulären Proteinverteilung in DCs und HeLa-Zellen gibt. Teil dieser Untersuchungen war die Identifikation endosomaler Kompartimente, mit denen das M-Protein oder andere Virusproteine wie H und N assoziieren.

## 2 Material

### 2.1 Zellen

#### 2.1.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien waren alle im Institut verfügbar. Im einzelnen handelte es sich hierbei um:

**Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinien**

Bezeichnung	Ursprung	Medium	Passage
Vero	Fibroblastenzelllinie (Niere), Afrikanische grüne Meerkatze (Cercopithecus aethiops)	MEM, 5 % FKS (fötales Kälberserum)	adhärent 2x wöchentlich mit ATV
B95a	B-Zelllinie, EBV-transformiert, Krallenaffe (Callithrix jacchus)	RPMI 1640, 5 % FKS	semiadhärent 2x wöchentlich mit ATV
CHO 3E10hTLR2	Epithelzelllinie (Ovar), Chinesischer Hamster (Cricetulus griseus)	HAM's F12, 10 % FKS, 400 U/ml Hygromycin, 0,5 mg/ml G418	adhärent 2x wöchentlich mit ATV
HeLa	Fibroblastenzelllinie (Cervixkarzinom), human	MEM, 5 % FKS	adhärent 2x wöchentlich mit ATV
293	Fibroblastenzelllinie (Niere), human embryonal	MEM, 10 % FKS	semiadhärent, 2x wöchentlich durch Abspülen von der Oberfläche
293-F(ED)	Fibroblastenzelllinie (Niere), human embryonal, stabil MV(ED) F-Protein- exprimierend	MEM, 10 % FKS, 0,5 mg/ml G418	semiadhärent, 2x wöchentlich durch Abspülen von der Oberfläche

Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinien (Fortsetzung)

Bezeichnung	Ursprung	Medium	Passage
293-F(WTF)	Fibroblastenzelllinie (Niere), human embryonal, stabil MV F(WTF)-Protein-exprimierend	MEM, 10 % FKS, 0,5 mg/ml G418	semiadhärent, 2x wöchentlich durch Abspülen von der Oberfläche
293-H(ED)	Fibroblastenzelllinie (Niere), human embryonal, stabil MV H-Protein-exprimierend	MEM, 10 % FKS, 0,5 mg/ml G418	semiadhärent, 2x wöchentlich durch Abspülen von der Oberfläche
BJAB	B-Zelllinie, lymphoblastoid (human)	RPMI 1640, 10 % FKS	in Suspension, 2x wöchentlich durch Zentrifugation
BJABpED	B-Zelllinie, lymphoblastoid (human), persistent mit MV ED infiziert	RPMI 1640, 10 % FKS	in Suspension, 2x wöchentlich durch Zentrifugation
BJABpWTF	B-Zelllinie, lymphoblastoid (human), persistent mit MV WTF infiziert	RPMI 1640, 10 % FKS	in Suspension, 2x wöchentlich durch Zentrifugation
B33102	Hybridomzelllinie, $\alpha$ -MV-M-Antikörper	RPMI 1640, 10 % FKS	in Suspension, 2x wöchentlich durch Zentrifugation
B347	Hybridomzelllinie, $\alpha$ -MV-M-Antikörper	RPMI 1640, 10 % FKS	in Suspension, 2x wöchentlich durch Zentrifugation

### 2.1.2 Primäre Zellen

Die verwendeten primären Zellen wurden aus einem Leukozytenkonzentrat isoliert. Das Leukozytenkonzentrat wurde aus dem Blut gesunder Spender am Institut für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinik Würzburg, gewonnen. Die Kultur der primären Zellen erfolgte in RPMI 1640, 10 % FKS in Anwesenheit von IL-4 (250 U/ml) und GM-CSF (500 U/ml).

### 2.1.3 Bakterien

*E. coli* XL10 gold

Stratagene

## 2.2 Viren

Alle in dieser Arbeit verwendeten Viren waren im Institut vorhanden.

Tabelle 2-2: Verwendete Masernviren

Virus	Verwendeter Rezeptor	Anzucht auf
Edmonston (ED); Vakzinestamm	CD46 CD150	Vero
Wildtyp Fleckenstein (WTF); Wildtyp	CD150	BJAB
Wü4797; Wildtyp	CD150	BJAB
Bilthoven; Wildtyp	CD150	BJAB

## 2.3 Plasmide

Alle MV M-Protein-codierenden Plasmide wurden durch Modifikation des eukaryotischen Expressionsvektors pCG(DC), der Restriktionsschnittstellen für die Enzyme *DraI* und *CspI* enthält, erzeugt. Die M-Gene stehen unter der Kontrolle des sehr frühen CMV-Promotors. Sie wurden im Labor von Dr. W. P. Duprex, Centre for Cancer Research and Cell Biology, School of Biomedical Sciences, Queen's University Belfast, Nordirland, erzeugt.

Der für HA-gekoppeltes Ubiquitin codierende Vektor wurde freundlicherweise von D. Lindemann, Universität Dresden, zur Verfügung gestellt, (Strack et al., 2000). Das Ubiquitin-Gen wurde unter Verwendung der Restriktionsschnittstellen für *NotI* und *EcoRI* in den Vektor pBJ5 inseriert.

Die beiden Plasmide, die für YFP-Vps4 und seine dominant negative Form codieren, wurden erzeugt, in dem die jeweiligen Gene unter Verwendung von *EcoRI*- und *XhoI*-Schnittstellen in das Plasmid pCR-3.1-YFP eingefügt wurden.

**Tabelle 2-3: Verwendete Plasmide**

Plasmid	kodiertes Protein
pCG-M(ED)	M-Protein MV(ED)
pCG-M(ED89K→E)	M-Protein MV(ED), in das eine Mutation eingeführt wurde, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 89 (Lysin [K] zu Glutaminsäure [E]) führt
pCG-M(WTF)	kodiert für das M-Protein des MV WTF
pCG-M(WTF89E→K)	M-Protein MV (WTF), in das eine Mutation eingeführt wurde, die zu einem Aminosäureaustausch an Position 89 (E) zu (K) führt
pBJ5-HA-Ub	HA-gekoppeltes Ubiquitin
pCR3.1-YFP-Vps4	gelb-fluoreszierendes-Protein (yellow-fluorescent protein, YFP)-gekoppeltes Vps4
pCR3.1-YFP-Vps4(228E→Q)	dominant-negative Form des YFP-gekoppelten Vps4 mit einem Aminosäureaustausch an Position 228 (E zu Glutamin [Q])

## 2.4 Antikörper

### 2.4.1 Unmodifizierte Primärantikörper und Seren

**Tabelle 2-4: Verwendete unmodifizierte Primärantikörper und Seren**

Spezifität	Klon, Bezeichnung	Isotyp	Hersteller
CD81	Z.81.1	Maus-IgG	Institut für Virologie, Würzburg
EEA-1		Kaninchen-IgG	Affinity BioReagents
HA	F-7	Maus-IgG2a	Santa Cruz Biotechnologies
Lamp-1	931-A	Kaninchen IgG	S. Carlsson, Universität Umeå
	25	Maus-IgG2b	BD Biosciences



Tabelle 2-4: Verwendete unmodifizierte Primärantikörper und Seren (Fortsetzung)

Spezifität	Klon, Bezeichnung	Isotyp	Hersteller
MV		Human-IgG	Institut für Virologie, Würzburg
MV-F	A5047 F42	Maus-IgG1 Kaninchen-IgG	Institut für Virologie, Würzburg
MV-H	H45 K4 K83	Kaninchen-IgG Maus-IgG2a Maus-IgG2a	Institut für Virologie, Würzburg
MV-M	B117 B347	Maus-IgG1 Maus-IgG	Institut für Virologie, Würzburg
MV-M	MAB8910	Maus-IgG	Chemicon
MV-N	F227	Maus-IgG2a	Institut für Virologie, Würzburg

## 2.4.2 Modifizierte Primärantikörper

Tabelle 2-5: Modifizierte Primärantikörper

Spezifität	Modifikation	Klon, Bezeichnung	Isotyp	Hersteller
CD3	FITC	UCHT1	Maus-IgG1 $\kappa$	BectonDickinson
CD14	FITC	RM052	Maus IgG2a	BectonDickinson
CD16	PE	3G8	Maus-IgG1 $\kappa$	BectonDickinson
CD19	FITC	HIB19	Maus-IgG1 $\kappa$	BectonDickinson
CD25	PE	M-A251	Maus-IgG1 $\kappa$	BectonDickinson
CD56	PE	B159	Maus-IgG1 $\kappa$	BectonDickinson
HLA-DR	PerCP	5681	Maus-IgG1	BectonDickinson

### 2.4.3 Sekundärantikörper und -reagenzien

Tabelle 2-6: Sekundärantikörper und -reagenzien

Spezifität	Modifikation	Isotyp	Hersteller
Human-IgG	Alexa488		Molecular Probes
Kaninchen-IgG	Alexa488		Molecular Probes
Kaninchen-IgG	Alexa594		Molecular Probes
Maus-IgG	FITC	Ziege-IgG	Dianova
Maus-IgG	Alexa488		Molecular Probes
Maus-IgG	Alexa594		Molecular Probes
Maus-IgG	12-nm-kolloidal-Gold	Ziege-IgG	Dianova
Straptavidin	Alexa594		Molecular Probes

## 2.5 Zellkulturmedien und Zusätze

Die Zellkulturmedien und Zusätze wurden, wenn nicht anders angegeben, in der Medienküche des Instituts für Virologie hergestellt.

### 2.5.1 Für eukaryotische Zellen

Medium	Anbieter
MEM	
RPMI 1640	
HAM's F12	PAA
5,6-%-Natriumhydrogencarbonat	
FKS	Biochrom
Penicillin/Streptomycin (100 I.E./ml)	
Ciprofloxacin (2mg/ml)	Bayer
G418	Calbiochem
Hygromycin	Calbiochem
IL-4	Promocell
GM-CSF	Berlex

<b>Medium</b>	<b>Anbieter</b>
MG132 (100 mM in DMSO)	Calbiochem
Fusionsinhibitorisches Peptid (FIP) (Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH)	Bachem
LPS	Sigma Aldrich
Pam <sub>3</sub> CSK <sub>4</sub>	EMC Microcollections GmbH

### 2.5.2 Für Bakterien

<b>Medium</b>	<b>Zusammensetzung</b>	
LB-Medium	10 g	Bacto-Trypton
	10 g	NaCl
	5 g	Hefeextrakt
		ad 1 l <i>Aqua bidest</i>
LB-Agar	wie LB-Medium	
	+ 15 g	Agar-Agar
		ad 1 l <i>Aqua bidest</i>
Ampicillin-Selektionsagar	wie LB-Agar	
	+ 50 mg/ml	Ampicillin
		ad 1 l <i>Aqua bidest</i>

## 2.6 Kits

<b>Kit</b>	<b>Anbieter</b>
Bicinchoninic Acid (BCA) Kit zur Proteinbestimmung	Sigma
ECL-Detektions-Reagenz	Amersham
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
QIAprep® Spin Miniprep Kit	Qiagen
Saint-Mix	Synvolux
SuperFect®	Qiagen

## 2.7 Reagenzien, Puffer und Lösungen

Die Chemikalien für alle verwendeten Puffer und Lösungen wurden bei den Firmen Applichem, Amersham, Bayer, Calbiochem, MBI Fermentas, PAA, Pharmacia, Promega, Sigma, Virion gekauft oder fertige Lösungen standen am Institut zur Verfügung.

1%ige Ethidiumbromid-Lösung

1%ige Hammelerythrozyten-Suspension

DNA-Größenstandard *1kb DNA ladder*

30 mM Anodenpuffer	3,6 g	Tris
	200 ml	Methanol
		ad 1 l <i>Aqua bidest</i> , pH 10,4

300 mM Anodenpuffer	36,0 g	Tris
	200 ml	Methanol
		ad 1 l <i>Aqua bidest</i> , pH 10,4

6 x Agarosegel-Ladepuffer

6 x SDS-Probenpuffer	0,5 M	Tris pH 6,8
	0,4 % (w/v)	SDS
	6 ml	Glycerol
	0,6 ml	$\beta$ -Mercaptoethanol
	2,4 mg	Bromphenolblau
		ad 20 ml <i>Aqua bidest</i>

7-Aminoaktinomycin-D (7-AAD)	Vorratslösung 1 mg/ml in DMSO
	Arbeitslösung 1:60 in FACS-Puffer

10 x Agarosegel-Laufpuffer	144,0 g	Glycin
	30,3 g	Tris
	50 ml	20%ige SDS-Lösung (w/v; in <i>Aqua bidest</i> )
		ad 1 l <i>Aqua bidest</i> , pH 8,7
2-Aminoethylisothiuronium- bromid (AET)-Lösung	2 g	AET
		ad 100 ml <i>Aqua bidest</i> , pH 9,0
Ammoniumsulfatlösung (gesättigt)	761 g	(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>
		ad 1 l PBS (Ca <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -frei)
DMSO		
Einfríermedium	20 %	DMSO
		ad FKS
Erythrozytenlyse-Puffer	10 ml	10 x KHCO <sub>3</sub>
		(1 g KHCO <sub>3</sub> ad 100 ml <i>Aqua bidest</i> )
	10 ml	10 x NH <sub>4</sub> Cl
		(8,3 g NH <sub>4</sub> Cl ad 100 ml <i>Aqua bidest</i> )
	20 µl	0,5 M EDTA, pH 8,
		ad 100 ml <i>Aqua bidest</i>
FACS-Puffer	0,5 % (w/v)	BSA
		0,02 % NaN <sub>3</sub>
		in PBS (Ca <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -frei)
Kathodenpuffer	5,2 g	Hexansäure
	3,0 g	Tris
	20 % (v/v)	Methanol
		ad 1 l <i>Aqua bidest</i> , pH 9,4

Milchpuffer	5 % (w/v)	Magermilchpulver
	0,05 % (v/v)	Tween 20
		in PBS (Ca <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -frei)
Natriumazid-Lösung	32 % w/v	
NP-40-Lysepuffer	120 mM	NaCl
	50 mM	HEPES, pH 7,4
	40 mM	β-Glycerophosphat
	10 mM	NaF
	1 mM	EDTA
	1 % (v/v)	NP-40
		Roche Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette /50 ml) <i>ad Aqua bidest</i>
NTE 2	10 mM	Tris-HCl, pH 7,4
	100 mM	NaCl
	1 mM	EDTA
		Roche Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette /50 ml) <i>ad Aqua bidest, pH 7,2</i>
NTE1-Lysepuffer	25 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1 mM	NaF
	0,1 % (v/v)	Brij 98 (Sigma)
		Roche Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette /50 ml) <i>ad Aqua bidest</i>

---

NTE1-Puffer	25 mM	Tris-HCl, pH 7,5
	150 mM	NaCl
	5 mM	EDTA
	1 mM	NaF
		Roche Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette /50 ml) <i>ad Aqua bidest</i>
PBS (Ca <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -frei)	80 g	NaCl
	2 g	KCl
	11,5 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> x H <sub>2</sub> O
	2 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
		<i>ad 1 l Aqua bidest</i>
Percoll-Lösungen		
Lösung 1 (1,076 g/ml):	4 ml	1,5 M NaCl
	21,688 ml	Percoll (1,129 g/ml)
	14,232 ml	<i>Aqua bidest</i>
Lösung 2 (1,059 g/ml):	4 ml	1,5 M NaCl
	16,469 ml	Percoll (1,129 g/ml)
	19,504 ml	<i>Aqua bidest</i>
Lösung 3 (1,045 g/ml):	4 ml	NaCl
	12,156 ml	Percoll (1,129 g/ml)
	23,844 ml	<i>Aqua bidest</i>

RIPA-Lysepuffer	0,15 mM	NaCl
	1 % (v/v)	NP-40
	0,5 % (w/v)	Na-Deoxycholat (DOC)
	0,1 % (w/v)	SDS
	50 mM	Tris-HCl, pH 8,0
	10 µg/ml	Pepstatin (1 mg/ml in Ethanol)
	10 mM	N-Ethylmaleimide (NEM, 1 M in Ethanol)
		Roche Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette /50 ml)
		<i>ad Aqua bidest</i>
Saccharose-Lysispuffer	10 mM	Tris-HCl, pH7,5
	250 mM	Sacharose
	1 mM	EDTA
		Roche Protease Inhibitor Cocktail (1 Tablette /50 ml) <i>ad Aqua bidest</i>
Saponin-FACS-Puffer	0,33 % (v/v)	Saponin in FACS-Puffer
Saponin-Puffer	0,33 % (w/v)	Saponin
	1 % (w/v)	BSA <i>ad PBS (Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-frei)</i>
TAE-Puffer (50x)	242 g	Tris
	57,1 ml	Essigsäure
	100 ml	EDTA (0,5 M; pH 8)
		<i>ad 1 l Aqua bidest</i>
TE-Puffer	10 mM	Tris-HCl <i>ad Aqua bidest, pH 8,5</i>



Tjb1	30 mM	K-Acetat
	100 mM	RbCl
	10 mM	CaCl <sub>2</sub>
	50 mM	MnCl <sub>2</sub>
	15 % (v/v)	Glycerol
		ad <i>Aqua bidest</i> , pH 5,8 (mit 0,2 N Essigsäure)
Tjb2	10 mM	MOPS
	75 mM	CaCl <sub>2</sub>
	10 mM	RbCl
	15 % (v/v)	Glycerol
		ad <i>Aqua bidest</i> , pH 7,0 (mit NaOH)
Triton-X-100-Lysepuffer	150 mM	NaCl
	50 mM	HEPES
	5 mM	EDTA
	1 % (v/v)	Triton X-100
		ad <i>Aqua bidest</i>
Trypanblau	0,25 % (w/v)	in PBS (Ca <sup>2+</sup> - und Mg <sup>2+</sup> -frei)
Versene-Lösung	1 g	KCl
	1 g	KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>
	2,86 g	Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>
	41 g	NaCl
	1 g	Versene
		ad 5 l <i>Aqua bidest</i>

## 2.8 Chemikalien

Chemikalie	Anbieter
Acrylamid	Applichem
Agarose	Applichem
Ammoniumchlorid	Applichem

---

<b>Chemikalie</b>	<b>Anbieter</b>
Amoniumpersulfat (APS)	Sigma
Ammoniumsulfat	Applichem
Brij98	Sigma
Bromphenolblau	Sigma
BSA	Applichem
Cacodylat	Roth
„Complete EDTA-free“ Protease Inhibitor Tabletten	Roche
DMSO	Applichem
EDTA	Sigma Aldrich
Ethanol	Applichem
Ficoll	Amersham
Fluoromount-G	SouthernBiotech
Glucose	Applichem
Glutardialdehyd	Roth
$\beta$ -Glycerophosphat	Applichem
Glycin	Applichem
HEPES	Applichem
Hexansäure	Sigma
Methanol	Applichem
Natrium-Deoxycholat (DOC)	Sigma
Natrium-Dodecylsulfat (SDS)	Applichem
NEM	Sigma
NP-40	Calbiochem
Osmiumtetroxid	Sigma
Paraformaldehyd	Applichem
Pepstatin	Sigma
Poly-L-Lysin	Sigma
Propylenoxid	Sigma
Protein-A-Sepharose	Pierce
Saccharose	Applichem
Saponin	Sigma

<b>Chemikalie</b>	<b>Anbieter</b>
TEMED	Applichem
Tris	Applichem
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma
Uranylacetat	Sigma

## 2.9 Verbrauchsmaterial

6-, 24-, 96 (1/2 area)-Napf-Zellkulturplatten	Greiner
<i>Chamber Slides, Lab-Tek II</i>	Nunc
0,5-, 1,5-, 2-ml-Reaktionsgefäße	Eppendorf
Zellschaber	Hartenstein
4-ml-Polypropylenröhrchen	Hartenstein
Kryoröhrchen	Greiner
50-, 250-, 550-ml-Zellkulturflaschen	Greiner
FACS-Röhrchen	Falcon
Dialyseschlauch	Roth
15-, 50-ml-Röhrchen	Greiner

## 2.10 Geräte

Brutschrank	Nuaire
Elektronenmikroskop EM10	Zeiss
FACS-Calibur	BectonDickinson
Gelelektrophoresekammern	Institutswerkstatt
Kippschwenker	Hartenstein
konfokales Laserscanningmikroskop LMS510 Meta, ausgestattet mit einem	Zeiss
Axiovert 200-Mikroskop	
Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz

Neubauerzählkammer	Marienfeld
pH-Meter	Hannah Instruments
Photometer	Eppendorf
Rundschüttler	Hartenstein
Sterilwerkbank	Nuaire
Vortexer	GLW
Wasserbäder	GFL
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich, Sorvall

## **2.11 Software**

AIDA	Raytest
für LSM510:	Zeiss
Software Version 3.2 SP2	

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

Alle verwendeten Zellen wurden in Plastikflaschen oder Multi-Napfplatten in Brutschränken bei 37° C in wasserdampfgesättigter Atmosphäre bei 5%igem CO<sub>2</sub>-Gehalt kultiviert. Die verwendeten Medien wurden mit 15 ml Natriumhydrogencarbonat gepuffert und mit Antibiotika (0,2 I.E./ml Penicillin/Streptomycin oder 10 µg/ml Ciprofloxacin) versetzt.

#### 3.1.1 Zellkultur adhärenter und semiadhärenter Zelllinien

Die adhärenenten bzw. semiadhärenenten Zelllinien wurden in den in Tabelle 2-1 angegebenen Medien kultiviert.

Nach Ausbildung konfluenter Zellrasen wurden die Zellen der adhärenenten Linien Vero, B95a, CHO 3E10hTLR2 und HeLa einmal mit ATV gewaschen und anschließend mit einem kleinen Volumen ATV abgelöst, resuspendiert und 1:5 bis 1:20 verdünnt in frischem Medium wieder in neue Zellkulturflaschen ausgesät.

Die semiadhärenenten Zelllinien 293, 293-F(ED), 293-F(WTF) und 293-H(ED) wurden in MEM mit 10 % FKS kultiviert, wobei das Medium für die drei stabil transfizierten Zelllinien 293-F(ED), 293-F(WTF) und 293-H(ED) als Zusatz 0,5 mg/ml G418 enthielt. Nach Ausbildung eines zu 80-90 % konfluenten Zellrasens wurden die Zellen mit frischem Medium vom Boden der Kulturflasche abgespült und 1:5 bis 1:10 verdünnt in frischem Medium wieder ausgesät.

#### 3.1.2 Zellkultur von Suspensionszelllinien

Die humane B-Zelllinie BJAB sowie die Hybridomzelllinien zur Gewinnung von Antikörpern wurden in RPMI 1640 mit 10 % FKS kultiviert. Die Zellen wurden 1- bis 2-mal wöchentlich 5 min lang bei 300 x g abzentrifugiert. Das Zellsediment wurde mit 10 ml frischem Medium resuspendiert und die Zellen 1:5 bis 1:10 in frischem Medium verdünnt erneut ausgesät.

### 3.1.3 Bestimmung der Lebendzellzahl

Zur Bestimmung der Lebendzellzahl wurde eine Vitalfärbung mit Trypanblau durchgeführt. Dazu wurden aus einer Zellsuspension 20 µl abgenommen und mit 20-80 µl Trypanblaulösung gemischt. 10 µl der Lösung wurden anschließend in eine Neubauerzählkammer gegeben. Der Farbstoff wird von toten Zellen aufgenommen, die dadurch blau erscheinen. Mit Hilfe des Lichtmikroskops wurde die Zahl der lebenden, ungefärbten Zellen ermittelt. Die Gesamtzellzahl in der vorhandenen Zellsuspension konnte mit Hilfe des Kammerfaktors errechnet werden. Die Zellsuspension wurde anschließend entsprechend der gewünschten Zellzahl verdünnt und für die weiteren Versuche verwendet.

### 3.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Zur Kryokonservierung der verwendeten Zellen wurden die Zellen zunächst abzentrifugiert (5 min, 300 x g, RT). Das gewonnene Zellsediment wurde in kaltem FKS resuspendiert und mit dem gleichen Volumen Einfriermedium versetzt. Die Zellen wurden zunächst für 1 h bei -20 °C eingefroren und anschließend auf -80 °C überführt. Die langfristige Lagerung erfolgte in flüssigem Stickstoff. Adhärente Zellen wurden in einer Konzentration von  $7,5 \times 10^6$  bis  $1 \times 10^7$  Zellen/ml, Suspensionszellen dagegen in einer Konzentration von  $1 \times 10^7$  bis  $2 \times 10^7$  Zellen/ml eingefroren.

Um die Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden diese zügig bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, mit einem Überschuss an vorgewärmtem Kulturmedium gewaschen und in dem entsprechenden frischen Medium ausgesät.

### 3.1.5 Mykoplasmentest

Um Kontaminationen mit Mykoplasmen auszuschließen, wurden alle verwendeten Zelllinien regelmäßig mit Ciprofloxacin behandelt und auf Mykoplasmenbefall getestet. Für den Test auf Mykoplasmenkontamination standen CHO 3E10hTLR2-Zellen zur Verfügung. Diese Zellen exprimieren stabil CD25 als Reportergen (ELAM-tac), welches unter einem NFκB (*nuclear factor kappa B*, NFκB)-abhängigen Promotor steht. Die Zellen exprimieren weiterhin den

humanen *toll-like receptor 2* (TLR2) (Medvedev et al., 2001) sowie CD14 als Korezeptor für eine NF $\kappa$ B-Aktivierung. Bei einer Kontamination mit Mykoplasmen (Takeuchi et al., 2000) wird der TLR2-Rezeptor aktiviert, daraufhin wird NF $\kappa$ B in den Kern transloziert und der CD25-Promotor aktiviert. Außerdem enthalten die Zellen endogenes TLR4, das bei Stimulation (durch beispielsweise LPS) ebenfalls NF $\kappa$ B aktiviert. Die Expression von CD25 ist also nur dann möglich, wenn TLR-Agonisten wie Endotoxine oder Mykoplasmen in der Kultur enthalten sind.

Für den Mykoplasmentest wurden  $5 \times 10^4$  CHO 3E10hTLR2-Zellen pro Napf in eine 24-Napfplatte ausgesät und ü. N. kultiviert. Zur Stimulation der Zellen wurden 10  $\mu$ g Gesamtprotein des zu testenden Virusstocks bzw. 50  $\mu$ l Zellkulturüberstand der zu testenden Zelllinien zu den CHO 3E10hTLR2-Zellen gegeben. Die zu testenden Zellen wurden vorher für mindestens zwei Passagen ohne Ciprofloxacin kultiviert. Als Positivkontrolle diente LPS (100 ng/ml) oder Pam<sub>3</sub>CSK<sub>4</sub> (2,5  $\mu$ g/ml), als Negativkontrolle (NK) Medium. Die Zellen wurden für weitere 12 bis 16 h kultiviert, mit Trypsin abgelöst und durchflusszytometrisch (siehe Abschnitt 3.5.1) auf die Expression von CD25 untersucht.

### 3.1.6 Isolierung humaner primärer mononukleärer Zellen aus einem Leukozytenkonzentrat

Bei primären mononukleären Zellen aus dem Blut (*peripheral blood mononuclear cells*, PBMC) handelt es sich um eine Mischpopulation aus T-, B- und NK-Zellen sowie Monozyten.

Zur Isolierung der PBMC wurde ein Leukozytenkonzentrat aus dem Blut eines gesunden Spenders in der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie der Universitätsklinik Würzburg gewonnen.

Dieses Konzentrat wurde zunächst 1:2 mit Versene verdünnt, auf Ficoll-Paque geschichtet (30 ml verdünnte Leukozytenlösung pro 9 ml Ficoll-Paque) und einer Dichtegradientenzentrifugation unterzogen (30 min, 2 min Anlauf, 2 min Auslauf, 400 x g, 4 °C). Nach der Auftrennung der zellulären Bestandteile entsprechend ihrer unterschiedlichen Dichte wurden die entstandenen

Interphasen abgenommen, in 50-ml-Röhrchen überführt und zwei- bis dreimal mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen (10 min, 300 x g, RT). Zur Bestimmung der Zellzahl (siehe Abschnitt 3.1.3) und zur Charakterisierung der PBMC-Population mittels Durchflusszytometrie wurden vor dem letzten Waschschrift 200  $\mu\text{l}$  Zellsuspension abgenommen.

Die Charakterisierung der erhaltenen PBMC erfolgte durch Färbung der Zellen mit einem Gemisch der nachfolgend aufgeführten monoklonalen Antikörper: CD3-FITC, CD14-FITC, CD19-FITC, CD16-PE, CD56-PE und HLA-DR-PerCP. Ein Drittel der so erhaltenen PBMC-Population wurde abzentrifugiert (300 x g, 10 min, RT) und eingefroren (3.1.4). Die übrigen zwei Drittel wurden für die Isolierung der Monozyten und T-Zellen verwendet.

### **3.1.7 Isolierung primärer Monozyten und T-Zellen aus einem Leukozytenkonzentrat**

Um die Monozyten zu gewinnen, wurden zunächst die T-Zellen mit Hilfe von Hammelerythrozyten rosettiert (Pellegrino et al., 1976). Durch eine nachfolgende Percoll-Dichtegradientenzentrifugation wurden die an Hammelerythrozyten gebundenen T-Zellen von der Monozyten-haltigen Zellfraktion separiert.

Hierzu wurde zunächst die 1%ige Lösung der Hammelerythrozyten abzentrifugiert (400 x g, 10 min, RT) und mit Alsevers gewaschen. Die Sedimente wurden in 4 % AET-Lösung resuspendiert und 20 min lang bei 37 °C im Wasserbad aktiviert, wodurch sich die Bindung CD2-positiver T-Zellen an die Oberfläche der Hammelerythrozyten verbessert. Nach mehrmaligem Waschen mit  $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS (10 min, 400 x g, 20 °C) wurden die Sedimente in RPMI 1640 mit 10 % FKS vorsichtig resuspendiert und auf 50 ml aufgefüllt. Jeweils  $3 \times 10^8$  PBMC wurden mit 13 ml Hammelerythrozyten-Suspension und 7 ml FKS gemischt, zentrifugiert (5 min, 200 x g, 4 °C) und 1 h lang auf Eis inkubiert. Die nach der Inkubation durch vorsichtiges Rollen wieder in Suspension gebrachten Zellen wurden auf Ficoll-Paque-Gradienten geschichtet (s. o.). Bei der nun folgenden 30-minütigen Zentrifugation (400 x g, ohne Bremse, 2 min Anlauf, 2 min Auslauf, 4 °C) sedimentieren die an Hammelerythrozyten gebundenen T-Zellen. Die Hammelerythrozyten wurden



mit Hilfe eines hypotonischen Erythrozytenlyse-Puffers für 2 bis 7 min lysiert. Zur Wiederherstellung des osmotischen Gleichgewichts wurden die Zellen einmal mit RPMI 1640/10 % FKS und anschließend zwei weitere Male mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen (300 x g, 10 min, RT). Zur Bestimmung der Zellzahl und zur Charakterisierung der gewonnenen Zellen wurden 200  $\mu\text{l}$  abgenommen und mit einem Gemisch aus monoklonalen CD3-FITC-, CD14-FITC-, CD19-FITC-, CD16-PE-, CD56-PE- und HLA-DR-PerCP-spezifischen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert (siehe Abschnitt 3.5.1). Diese Population der  $\text{CD3}^+ \text{CD14}^- \text{CD19}^-$  T-Zellen wurde mit Einfriermedium versetzt, in Kryoröhrchen aliquotiert und eingefroren (Abschnitt 3.1.4).

Die vorwiegend Monozyten- sowie B- und NK-Zellen-enthaltenden Interphasen wurden abgenommen und für die Isolierung der Monozyten verwendet. Um sie von den übrigen Zellen zu trennen, wurde eine diskontinuierliche Percollgradientenzentrifugation (Hilkens et al., 1997) angeschlossen. Dazu wurden drei Percoll-Lösungen unterschiedlicher Dichte hergestellt. Die Lösung mit der geringsten Dichte wurde mit den Lösungen größerer Dichte unterschichtet (je 2 ml/Lösung). Die zuvor dreimal mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschenen Zellen wurden nach dem letzten Waschschrift in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS aufgenommen und auf die Gradienten verteilt (2 ml/Gradient). Die Gradienten wurden 30 min lang zentrifugiert (2 min Anlauf, 2 min Auslauf, 400 x g, 4 °C). Die Suspension der gewonnenen, in 50-ml-Röhrchen überführten Zellen dieser Interphasen wurde mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS aufgefüllt und 10 min lang bei 300 x g, RT zentrifugiert. Dieses Waschen der Zellen wurde 2- bis 3-mal wiederholt. Zur Zellzahlbestimmung (Abschnitt 3.1.3) und durchflusszytometrischen Charakterisierung wurden vor dem letzten Waschen 200  $\mu\text{l}$  der Zellsuspension abgenommen. Die Färbung zur Analyse im Durchflusszytometer erfolgte mit einem Gemisch verschiedener monoklonaler Antikörper (CD3-FITC, CD14-FITC, CD19-FITC, CD16-PE, CD56-PE und HLA-DR-PerCP) (siehe Abschnitt 3.5.1). Die Fraktion der Monozyten ( $\text{CD14}^+$ ) wurde mit Einfriermedium gemischt, in Kryoröhrchen aliquotiert, eingefroren (siehe

Abschnitt 3.1.4) und später für die Differenzierung zu DCs genutzt (siehe Abschnitt 3.1.8).

### 3.1.8 *In-vitro*-Differenzierung humaner DCs aus Monozyten

DCs können *in vitro* aus Monozyten generiert werden. Während der sechs- bis siebentägigen Kultur in IL-4- und GM-CSF-haltigem Medium (Sallusto & Lanzavecchia, 1994) verlieren die Monozyten ihren typischen Oberflächenmarker CD14 und exprimieren für unreife DCs typische Oberflächenmoleküle, zu denen CD1a, MHC II (niedrig), CD11c, LFA-1, ICAM-1 und DC-SIGN gehören.

Die Monozyten wurden zügig im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und in 50 ml RPMI 1640 mit 10 % FKS gewaschen (10 min, 350 x g, RT). Von dem in 10 ml Medium (RPMI 1640/10 % FKS) resuspendierten Sediment wurde die Zellzahl bestimmt (siehe Abschnitt 3.1.3), auf  $0,5 \times 10^6$ /ml eingestellt und je 3 ml in einen Napf einer 6-Napf-Zellkulturplatte ausgesät. Das Medium wurde mit 500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 versetzt. Während der darauf folgenden sechstägigen Kultur wurden ein Teil des Mediums sowie die Zytokine alle zwei Tage ersetzt. Dazu wurde jeweils 1 ml Medium/Napf entfernt. Das gesammelte Medium wurde für 5 min (350 x g, RT) zentrifugiert, das entstandene Zellsediment in dem gleichen Volumen frischem RPMI 1640/10 % FKS resuspendiert, mit frischen Zytokinen versetzt und zurück in die Zellkulturplatte gegeben. Um reife DCs zu erhalten, wurde dem Kulturmedium am Tag fünf oder sechs der Kultur 100 ng/ml LPS zugegeben. Nach weiteren 24 h Kultur zeigten die DCs den typischen Phänotyp reifer DCs, für den die hohe Expression von Reifungsmarkern wie CD80, CD83 oder CD86 sowie MHC-II charakteristisch ist.

## 3.2 Virologische Methoden

### 3.2.1 Herstellung von Viruspräparationen

Die in dieser Arbeit verwendeten Viren wurden entweder auf adhärenenten Vero-Zellen gezüchtet oder auf der humanen B-Zelllinie BJAB (siehe Tabelle 2-2), was mit der Nutzung unterschiedlicher Rezeptoren durch Impf- und Wildtypstämme zusammenhängt. (siehe Abschnitt 1.1.2).

Für die Produktion des Impfstammes ED wurde ein konfluent Verozellrasen ( $\sim 1 \times 10^7$  Zellen/550-ml-Zellkulturflasche) mit einer Infektionsdosis (*multiplicity of infection*, MOI) von 0,01 infiziert. Dazu wurde das vorhandene Medium abgesaugt. Das entsprechende Volumen Virussuspension wurde in 10 ml MEM, ohne FKS pro Flasche aufgenommen, auf die Zellen pipettiert und 1 h lang bei 20 °C auf einem Kippschwenker inkubiert, bevor das Virus-Inokulum wieder entfernt und durch frisches MEM mit 5 % FKS (20ml/Flasche) ersetzt wurde. Die weitere Kultur erfolgte bei 37 °C. Sobald 80 bis 90 % der Zellen einen zytopathischen Effekt (*cytopathic effect*, CPE) zeigten, wurde das Medium entfernt und die Zellen wurden mit 2 ml PBS ( $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -frei) pro Flasche ü. N. bei -20 °C eingefroren. Nach dem schnellen Wiederauftauen wurde der verbliebene Zellrasen mit einem Zellschaber gelöst und die Suspension in 50-ml-Röhrchen überführt. Um zellassoziertes Virus freizusetzen und Zelltrümmer zu entfernen, erfolgte eine 15-minütige Zentrifugation bei 0 °C und 1000 x g. Der Überstand wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

Der Wildtypstamm WTF wurde auf der Suspensionszelllinie BJAB kultiviert. Dazu wurden zunächst  $5 \times 10^7$  BJAB Zellen abzentrifugiert (300 x g, 5 min), in 5 ml RPMI 1640 ohne FKS aufgenommen und mit einer MOI von 0,01 infiziert. Die Virus-Zell-Suspension wurde anschließend bei 37 °C 1 bis 2 h lang im Brutschrank bei 37 °C inkubiert und währenddessen mehrfach invertiert. Anschließend wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 5 min, RT), in 50 ml RPMI 1640 mit 10 % FKS aufgenommen und in eine Zellkulturflasche überführt. Nach 2 bis 3 Tagen Kultur und Ausbildung eines deutlichen CPE wurden die infizierten Zellen dieser Präinfektion auf frische BJAB-Zellen verteilt und so

lange weiter kultiviert, bis 80 bis 90 % der Zellen einen deutlichen CPE zeigten. Daraufhin wurden die Zellen abzentrifugiert (300 x g, 10 min, RT) und die erhaltenen Sedimente in 2 bis 3 ml  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS pro Sediment aufgenommen, gut resuspendiert und ü. N. bei  $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$  eingefroren. Nach dem zügigen Wiederauftauen der Zellen wurde die Zellsuspension für 1 bis 2 min gevortext und anschließend zentrifugiert (1000 x g, 15 min,  $0\text{ }^{\circ}\text{C}$ ). Der Überstand wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei  $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$  gelagert.

Parallel zur Anzucht der Viren wurden nicht-infizierte Zellen der jeweils verwendeten Zelllinien Vero oder BJAB kultiviert und so aufgearbeitet wie für die Viruspräparationen beschrieben. Diese Präparationen dienten als Mockkontrollen.

### 3.2.2 Bestimmung des Virustiters

Zur Bestimmung des Virustiters wurde die kulturinfektiöse Dosis  $\text{TCID}_{50}$  (*Tissue culture infectious dose*) bestimmt. Diese gibt die Verdünnung einer virushaltigen Lösung an, die ausreicht, um 50 % der Zellen zu infizieren. Für eine Endpunkttitration wurden  $5 \times 10^4$  B95a Zellen pro Napf in eine 96-Napfplatte (*half area*) ausgesät und ü. N. kultiviert. Von den zu titrierenden Viruspräparationen wurde eine logarithmische Verdünnungsreihe (1:10) in RPMI ohne FKS hergestellt. Pro Verdünnungsstufe wurden acht Nöpfe der 96-Napf-Zellkulturplatte mit jeweils 100  $\mu\text{l}$  Virusverdünnung versetzt, die Zellen wurden anschließend für 1 h bei  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  inkubiert. Nach dem Absaugen des Inokulums wurden in jeden Napf 100  $\mu\text{l}$  RPMI 1640 mit 5 % FKS gegeben. Nach drei und fünftägiger Kultur wurde lichtmikroskopisch die Anzahl der Nöpfe bestimmt, in denen ein CPE auftrat. Anhand dieser Werte konnte die  $\text{TCID}_{50}$  mit Hilfe der Formeln nach Spearman und Kärber (siehe Formel 3-1 und Formel 3-2) (Kärber, 1931, Spearman, 1908) berechnet werden.

$$\log TCID50 = x_{p=1} + \frac{1}{2}d - d \sum p$$

**Formel 3-1: Formel zur Bestimmung der 50 % Endpunkttitration.**  $x_{p=1}$  = dekadischer Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch in allen Ansätzen ein CPE sichtbar ist,  $d$  = dekadischer Logarithmus des Verdünnungsfaktors,  $p$  = Anteil an CPE positiven Näpfen pro Verdünnungsstufe,  $\sum p$  = Summe aller  $p$  ab der Verdünnungsstufe  $x_{p=1}$  und den  $p$ -Werten aller höheren Verdünnungen mit beobachtetem CPE. Berechnet wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe, bei der 50 % der Ansätze einen CPE aufweisen.

$$SE \log TCID50 = \sqrt{d^2 \sum \frac{p(1-p)}{n-1}}$$

**Formel 3-2: Formel zur Berechnung des Standardfehlers der TCID50.**  $d$  = dekadischer Logarithmus der Verdünnungsstufe,  $p$  = Anteil an CPE positiven Näpfen pro Verdünnungsstufe,  $n$  = Anzahl der Näpfe pro Verdünnungsstufe.

### 3.2.3 Infektion von adhärennten und semiadhärennten Zelllinien

Am Tag vor der Infektion wurden die Zellen in 24- oder 6-Napf-Zellkulturplatten ausgesät, so dass sie ü. N. im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> adhärennten konnten. Die Infektion des etwa 70 % konfluenten Zellrasens erfolgte durch Entfernen des Mediums und Zugabe der entsprechenden Menge an Virus- oder Mocksuspension in 0,5 bzw. 1 ml des jeweiligen zur Kultivierung verwendeten Medientyps ohne FKS und einstündige Inkubation bei 37 °C. Im Anschluss wurde das Inokulum abgenommen und durch 1 bzw. 2,5 ml Medium mit FKS ersetzt, das mit 200 mM FIP versetzt war, um die Zell-Zellfusion zu verhindern (Richardson et al., 1980). Nach 24 oder 48 h Infektionsdauer bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen für die jeweiligen Experimente verwendet.

### 3.2.4 Infektion von Suspensionszelllinien und DCs

Zur Infektion der Suspensionszellen wurden diese gezählt und die entsprechende Zellmenge in einem 15-ml-Röhrchen abzentrifugiert (5 min, 300 x g, RT). Die Zellen wurden anschließend in der entsprechenden Menge der Virus- oder Mockpräparation resuspendiert und das Volumen mit 0,5 bis 1 ml RPMI 1640 ohne FKS aufgefüllt. Für die Infektion der DCs enthielt das Medium zusätzlich 500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4. Nach einer

einstündigen Inkubationszeit wurden die Zellen erneut sedimentiert, in frischem RPMI 1640/10 % FKS aufgenommen, das Zytokine (s. o.) sowie 200 mM FIP enthielt. Die Zellzahl wurde auf  $0,5 \times 10^6$ /ml eingestellt und die Zellen in 24- oder 6-Napf-Zellkulturplatten ausgesät. Nach 24 oder 48 h Infektionsdauer bei 37 °C im Brutschrank wurden die Zellen für die jeweiligen Experimente verwendet.

### 3.3 Molekularbiologische Methoden

#### 3.3.1 Herstellung kompetenter Bakterien

10 ml LB-Medium wurden mit einer Kolonie von *E. coli* XL10 gold angeimpft und ü. N. bei 37 °C und 180 rpm im Rundschüttler inkubiert. Von der Übernacht-Vorkultur diente 1 ml zum Animpfen einer 100-ml-Hauptkultur in LB-Medium, die 2 bis 3 h bei 37 °C und 180 rpm bis zum Erreichen einer optischen Dichte von 0,2 bis 0,3 bei 600 nm (OD<sub>600</sub>) geschüttelt wurde. Danach wurden die Bakterien 10 min lang bei 4000 x g in einem JA-10-Rotor bei 4 °C abzentrifugiert. Das Sediment wurde in 150 ml Tbj1 resuspendiert und erneut zentrifugiert (10 min, 3000 x g, 4 °C). Nun wurde das Sediment in 6 ml Tbj2 resuspendiert und in 200 µl Aliquots in sterilen Kryoröhrchen bei -80 °C aufbewahrt.

#### 3.3.2 Transformation von Bakterien

Von der zu transformierenden Plasmid-DNA wurden 10 bis 50 ng (in TE-Puffer) mit 100 µl der kompetenten Bakterien gemischt und zunächst 5 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend erfolgte eine Inkubation für 5 min im Eisbad. Danach wurde 1 ml LB-Medium dazu pipettiert und die Suspension 15 min bei RT stehen gelassen, bevor sie 100 min lang bei 37 °C und 180 rpm geschüttelt wurde. Je 50 bis 100 µl der Bakteriensuspension wurden auf Ampicillin-Selektionsagar ausplattiert und im Brutschrank bei 37 °C ü. N. inkubiert. Gewachsene Einzelkolonien wurden zum Animpfen von Bakterienkulturen für die Präparation von Plasmid-DNA verwendet.

### 3.3.3 Präparation von Plasmid-DNA

Die Plasmidpräparation aus Bakterien diente zur Gewinnung reiner Plasmid-DNA, die für Transfektionsexperimente verwendet wurde. Abhängig von der gewünschten DNA-Menge erfolgte die Reinigung mit dem *QIAprep® Spin Miniprep Kit* (4 ml Kulturvolumen) oder dem *EndoFree® Plasmid Maxi Kit* (100 ml Kulturvolumen) entsprechend dem Protokoll des Herstellers.

### 3.3.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Die DNA-Konzentration wurde durch Messung der Absorption bei 260 nm mit dem Eppendorf BioPhotometer bestimmt. Dazu wurde die zu messende DNA-Lösung 1:100 in H<sub>2</sub>O verdünnt.

Die Berechnung der DNA-Konzentration erfolgt nach folgender Formel:

$$c[\text{ng / ml}] = OD_{260} \times V \times F$$

**Formel 3-3: Formel zur Berechnung der DNA-Konzentration.** V= Verdünnungsfaktor, F= Multiplikationsfaktor (für doppelsträngige DNA = 50)

### 3.3.5 Agarosegelelektrophorese

Um sicher zu stellen, dass die isolierte Plasmid-DNA rein und von der zu erwartenden Größe war, wurde 1 µg der Plasmid-Präparation auf ein 1%iges TAE-Agarosegel aufgetragen, das mit 5 µl Ethidiumbromidlösung versetzt worden war. Bei Ethidiumbromid handelt es sich um eine DNA-interkalierende Substanz, die bei Anregung mit UV-Licht zur Emission von orangerotem Licht führt. Das entsprechende Volumen der Plasmid-Präparation wurde mit 2 µl 6 x Agarosegel-Ladepuffer versetzt, mit H<sub>2</sub>O auf 12 µl aufgefüllt und auf das Gel aufgetragen. Zur Überprüfung der Größe wurden zusätzlich 5 µl des DNA-Größenstandards aufgetragen. Die elektrophoretische Auftrennung erfolgte bei 90 V in TAE-Puffer. Anschließend wurde die im Agarosegel aufgetrennte DNA mit UV-Licht (280 nm) sichtbar gemacht.

## 3.4 Transfektionen

### 3.4.1 Transiente Proteinexpression in 293-Zellen mit Saint-Mix-Transfektionsreagenz

Am Vortag der Transfektion wurden pro Vertiefung einer 6-Napf-Zellkulturplatte  $1 \times 10^6$  bzw.  $2 \times 10^4$  293-Zellen pro Vertiefung in einer 24-Napf-Zellkulturplatte ausgesät und ü. N. bei 37 °C im Brutschrank bis zu einer Konfluenz von etwa 70 bis 80 % adhären lassen. Am folgenden Tag wurden pro Napf zu transfizierender Zellen in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß 80 µl HBS mit 20 µl Saint-Mix (6-Napf-Platte) bzw. 20 µl HBS mit 5 µl Saint-Mix (24-Napf-Platte) gemischt. In einem separaten Reaktionsgefäß wurden 100 µl bzw. 25 µl HBS mit einer Gesamtmenge von 1 bzw. 0,25 µg Plasmid-DNA versetzt. Beide Gemische wurden 1 bis 5 min lang bei RT inkubiert, anschließend miteinander gemischt und innerhalb von 5 min mit 800 µl MEM+5 %FKS+Antibiotika versetzt. Nach Absaugen des Mediums wurde der Transfektionsmix vorsichtig auf den Zellrasen im Napf pipettiert. Die Zellen wurden 24 oder 48 h lang im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

### 3.4.2 Transiente Proteinexpression in HeLa-Zellen mit SuperFect®-Transfektionsreagenz

Einen Tag vor der Transfektion von HeLa-Zellen wurden in Platten mit 6 Vertiefungen je  $2 \times 10^5$  bzw. in Platten mit 24 Vertiefungen  $7,5 \times 10^4$  Zellen ausgesät und ü. N. bei 37 °C zur Ausbildung eines etwa 70 % konfluenten Zellrasens adhären lassen. Am folgenden Tag wurde in einem 1,5-ml-Reaktionsgefäß ein Transfektionsansatz zusammenpipettiert. Dazu wurden 100 bzw. 60 µl serum- und antibiotikafreies MEM vorgelegt, mit 2 bzw. 1 µg der Plasmid-DNA gemischt und 10 bzw. 5 µl SuperFect®-Transfektionsreagenz dazu gegeben und 5 s lang gevortext. Während einer 5-minütigen Inkubationszeit bei RT erfolgte das Waschen der Zellen mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS (4 bzw. 1 ml pro Napf). Zu jedem Ansatz wurden 600 bzw. 350 µl MEM/5 % FKS mit Antibiotika pipettiert, gemischt und auf die Zellen gegeben. 2 bis 3 h wurden die Zellen auf einem Kippschwenker bei RT inkubiert, anschließend mit



Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS gewaschen und mit 2,5 bzw. 1 ml MEM/5 % FKS/Antibiotika bedeckt. Zur Expression der Proteine wurden die Zellen 24 oder 48 h lang im Brutschrank bei 37 °C inkubiert.

### 3.5 Durchflusszytometrie

Alle Färbungen zur durchflusszytometrischen Analyse wurden in einem Drei- bzw. Vierfarben-Durchflusszytometer (*fluorescence-activated cell sorter*, FACS) gemessen (FACS-Calibur™; Becton Dickinson) und  $1 \times 10^4$  Ereignisse gezählt. Die Auswertung erfolgte mit Hilfe der CellQuestPro Software.

#### 3.5.1 Extrazelluläre Färbungen

Für den Nachweis von Oberflächenproteinen wurden extrazelluläre Antikörperfärbungen von  $5 \times 10^4$  Zellen pro Ansatz durchgeführt. Zunächst wurden die Zellen mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 350 x g, 4 °C) und mit 50 µl einer entsprechend in FACS-Puffer verdünnten Antikörperlösung 30 min lang auf Eis inkubiert. Sofern die verwendeten Antikörper nicht direkt mit den Fluoreszenzfarbstoffen konjugiert waren, folgte nach einem Waschschrift mit FACS-Puffer (s. o.) eine weitere 30-minütige Inkubation bei 4 °C mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper (50 µl/Färbung). Unmittelbar vor der Analyse wurden die Zellen in einigen Fällen mit 25 µl einer 7-AAD-Lösung versetzt. Der Farbstoff wird nur von toten Zellen aufgenommen und ermöglicht auf diese Weise eine Unterscheidung zwischen lebenden und toten Zellen. Bei jeder Messung wurden  $1 \times 10^4$  (lebende) Zellen gemessen. Zur Überprüfung erfolgten Isotyp-, Positiv- sowie Negativkontrollfärbungen.

#### 3.5.2 Intrazelluläre Färbungen

Zum Nachweis von intrazellulären Proteinen wurden  $1 \times 10^5$  Zellen pro Ansatz eingesetzt. Die Zellen wurden mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen (5 min, 350 x g, 4 °C) und mit 100 µl 4%igem Paraformaldehyd (in Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-freiem PBS)

fixiert. Zur Permeabilisierung der Zellmembran nach erneutem Waschen wurden die Zellen mit Saponin-FACS-Puffer (1 ml pro Färbung) 20 min lang bei RT inkubiert. Nach Zentrifugation und Abnahme des Überstands erfolgte die Färbung mit 50 µl der entsprechend in Saponin-FACS-Puffer verdünnten monoklonalen Primärantikörper 30 min lang bei RT. Einem Waschschrift mit 1 ml Saponin-FACS-Puffer schloss sich zur Detektion der unmarkierten Antikörper die Färbung mit einem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Sekundärantikörper an. Die Inkubation geschah in gleicher Weise wie für den Primärantikörper. Ein letzter Waschschrift mit FACS-Puffer entfernte restliches Saponin. Zur Überprüfung erfolgten Isotyp-, Positiv- sowie Negativkontrollfärbungen.

## 3.6 Mikroskopie

### 3.6.1 Fluoreszenzmikroskopie

Für die Färbung von Proteinen wurden die Zellen adhärenter Zelllinien am Tag vor der Infektion oder Transfektion in 24-Napf-Zellkulturplatten, auf deren Boden sich Deckgläschen befanden, ausgesät und nach 24 h einmal mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen.

Wenn DCs gefärbt wurden, so wurden die bereits infizierten Zellen direkt vor dem Färben auf Objektträger aufgebracht, die mit Hilfe einer aufgeklebten Plastikkonstruktion in acht Kammern unterteilt waren (*chamber slides*). Zunächst wurden dafür 100 µl einer 1:10 in  $\text{H}_2\text{O}$  verdünnten Poly-L-Lysin-Lösung in die Kammern pipettiert, um ein Anhaften der Zellen zu ermöglichen (10 min, RT). Der Überschuss der Lösung wurde abgenommen und mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen.  $5 \times 10^4$  der niedertourig sedimentierten DCs (1 min, 200 x g, RT) wurden in einem Restvolumen des Kulturmediums (100 µl/Ansatz) resuspendiert und in die Kammern verteilt. Das Anheften der Zellen an die Objektträgeroberfläche und die Wiederausbildung der

charakteristischen Morphologie erfolgten bei 37 °C im Brutschrank innerhalb von 30 bis 45 min.

Die Fixierung der Zellen geschah durch eine 20-minütige Inkubation mit 4%igem Paraformaldehyd (in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS). Die Zellen wurden ein weiteres Mal vorsichtig gewaschen, mit Saponin-Puffer permeabilisiert (20 min, RT) und wieder gewaschen. Zur Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen wurden die Zellen 20 min lang mit einer 5%igen BSA-Lösung (in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS) behandelt.

Die Färbung der Deckglaskulturen erfolgte in einer feuchten Kammer, einer verschließbaren Plastiksachtel, deren Boden mit einem feuchten von einem Streifen Parafilm bedeckten Whatman-Papier ausgelegt war. Auf den Parafilm wurden Tropfen der jeweiligen Antikörperverdünnungen (30  $\mu\text{l}$ /Färbung) pipettiert und die Deckgläschen mit der Zell-behafteten Seite darin inkubiert.

Die DCs wurden mit 100  $\mu\text{l}$  der Antikörperlösungen pro Kammer des *Chamber slides* behandelt. Die Antikörper wurden in allen Fällen in 1%igem BSA in PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) verdünnt.

Die Färbung mit den Antikörpern dauerte jeweils 1 h bei 4 °C. Nach jedem Färbeschritt wurden die Zellen dreimal mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen.

Zunächst erfolgte die Inkubation mit dem unmarkierten Primärantikörper, gefolgt von einem Fluoreszenzfarbstoff-gekoppelten Sekundärantikörper. Bei Doppelfärbungen wurde nacheinander mit dem ersten Primärantikörper und dem zweiten Primärantikörper aus unterschiedlichen Spezies gefärbt. Daran schloss sich eine Inkubation mit einem Gemisch aus zwei mit unterschiedlichen Fluoreszenzfarbstoffen gekoppelten Sekundärantikörpern an. Bei Verwendung des biotinylierten  $\alpha$ -MV-M-Antikörpers B33102 wurde in folgender Reihenfolge gefärbt: unkonjugierter Primärantikörper, Fluoreszenzfarbstoff-markierter Sekundärantikörper, gefolgt von dem biotinylierten  $\alpha$ -M-Antikörper und zu dessen Detektion dem Fluoreszenzfarbstoff-markierten Streptavidin, das mit hoher Affinität an Biotin bindet.

Anschließend wurden die Zellen mit Fluoromount eingedeckt und mit dem konfokalen Lasermikroskop unter Verwendung der 488- und 564-nm-Laserkennlinien (Argon/Helium-Neon-Laser) untersucht und Aufnahmen gemacht.

### 3.6.2 Transmissionselektronenmikroskopie

Die infizierten oder transfizierten 293-Zellen wurden auf Deckgläschen in Zellkulturplatten kultiviert. Vor der Fixierung wurden sie vorsichtig mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS gewaschen, dann mit 2,5%igem Glutardialdehyd in 0,05 M Cacodylat-Puffer 30 min lang bei RT fixiert und mit 0,05 M Cacodylat-Puffer (in  $\text{H}_2\text{O}$ ) gewaschen. Die Kontrastierung erfolgte durch Behandlung der Zellen mit 2%igem Osmiumtetroxid (in  $\text{H}_2\text{O}$ ), das mit  $\text{H}_2\text{O}$  nach 30-60 min entfernt wurde. Ü. N. wurden die Präparate in 0,5%igem Uranylacetat eingelegt, mit Wasser gewaschen und nachfolgend stufenweise entwässert. Zu diesem Zweck wurden die Proben für jeweils 5 min in eisgekühlte Ethanolverdünnungen aufsteigender Konzentration getaucht (50 %, 70 %, 90 %, 96 %). Darauf folgte für je zweimal 5 min eine Behandlung mit 100 % Ethanol und Propylenoxid. Bevor die Proben ü. N. bei 60 °C in einer Gelatine kapsel in reines Epon eingebettet wurden, waren sie für 2 bis 4 h in einem Propylenoxid/Epon-Gemisch (1:1) eingelegt. Nach Entfernen des Deckglases wurde die Probe geschnitten, auf Trägernetze aufgebracht und mit dem Transmissionselektronenmikroskop untersucht.

### 3.6.3 Transmissionselektronenmikroskopie mit Immunlokalisation

Nach der Infektion oder Transfektion der 293-Zellen wurden diese mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS vom Boden einer 6-Napf-Zellkulturplatte abgespült, durch Zentrifugation gewaschen (5 min, 350 x g, RT) und das Sediment in frischem 4%igem Paraformaldehyd (in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS) 1 h lang fixiert. Das Absättigen freier Aldehydgruppen wurde durch 15-minütige Inkubation mit 50 mM Ammoniumchlorid (in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS) erreicht, die von fünfmaligem jeweils dreiminütigem Waschen mit  $\text{H}_2\text{O}$  bei 4 °C gefolgt wurde. In einer aufsteigenden Ethanolreihe (30 %, 50 %, 70 %, 90 %, 100 %) wurden die Präparate entwässert. Dafür wurden sie je zweimal für 15 min in dem 30%igen Ethanol inkubiert, für je 30 min in dem 50-, 70- und 90%igen Ethanol

und 60 min in reinem Ethanol. Ü. N. wurden die Proben bei 4 °C in einem 100 % Ethanol/LR-White-Gemisch aufbewahrt und eine weitere Nacht in reinem LR-White. Nach einer weiteren drei- bis vierstündigen Inkubation in LR-White bei RT folgte die Polymerisation des LR-White bei 40 °C für mindestens 3 Tage in einer Gelatine kapsel. Anschließend wurden Ultradünnschnitte von den eingebetteten Proben gemacht und auf Trägernetze gebracht. Die mit den Dünnschnitten beschichteten Netze wurden nacheinander für je 5 min in einem Tropfen PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) und PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) versetzt mit 1 % BSA und 0,1 % Tween 20 inkubiert. Die Färbung mit dem Primärantikörper, der in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS+1 % BSA und 0,1 % Tween 20 verdünnt wurde, dauerte bei RT 1 h lang. Nicht-gebundener Antikörper wurde danach entfernt, indem die Netze kurz mit PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei)+1 % BSA und 0,1 % Tween 20 gespült wurden und danach zweimal 10 min in einem Tropfen dieser Lösung gewaschen wurden. Ein ebensolcher Waschschrift folgte mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS, das 0,1 % BSA und 0,1 % Tween 20 enthielt. Die Färbung mit dem sekundären  $\alpha$ -Maus-IgG-Antikörper, an den kolloidale 12-nm-Gold-Partikel gebunden waren, dauerte bei RT 1 h lang. Dieser Antikörper wurde in PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei)+0,1 % BSA und 0,1 % Tween 20 verdünnt. Ungebundener Antikörper wurde nach dem folgenden Schema entfernt:

- Abspülen mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS versetzt mit 0,1 % BSA und 0,1 % Tween 20,
- zweimal 10 min lang mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS versetzt mit 0,1 % BSA und 0,1 % Tween 20 waschen,
- 5 min lang mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem waschen,
- 2 min lang in 1,25 % Glutardialdehyd (in  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS) inkubieren und abschließend
- dreimal 5 min mit  $\text{H}_2\text{O}$  waschen.

Kontrastiert wurden die Proben 5 bis 6 min lang in 2%igem Uranylacetat (in  $\text{H}_2\text{O}$ ), gefolgt von einem Waschschrift mit  $\text{H}_2\text{O}$  (zweimal) und einer 4- bis 5-minütigen Inkubation in Bleicitrat, nach der erneut gewaschen wurde.

Die getrockneten Proben standen danach zur Untersuchung mit dem Transmissionselektronenmikroskop zur Verfügung.

## 3.7 Proteinbiochemische Methoden

### 3.7.1 Aufreinigung monoklonaler Antikörper

Die in dieser Arbeit verwendeten Hybridomzelllinien, die Antikörper gegen verschiedene Strukturproteine des MV produzieren, wurden in RPMI 1640 kultiviert, das 10 % FKS enthielt. Der gesammelte Zellkulturüberstand wurde bis zur Aufreinigung bei 4 °C gelagert. Die im Überstand enthaltenen Antikörper wurden durch mehrmaliges Präzipitieren mit gesättigter Ammoniumsulfatlösung ( $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ) gewonnen. Bei dem Vorgang handelt es sich um eine Dehydration, die dem sich in Lösung befindenden Protein (Antikörper) die Wassermoleküle entzieht. Je mehr Ammoniumsulfat in der Lösung vorhanden ist, desto weniger Wasser steht für die Wechselwirkung mit den Proteinen zur Verfügung, die dann ausfallen.

Der Überstand wurde dazu im Eisbad langsam gerührt. Das gleiche Volumen gesättigter Ammoniumsulfatlösung wurde mit Hilfe eines Scheidetrichters langsam in den Überstand getropft. Nach Zugabe des gesamten Volumens wurde weitere 2 bis 3 h lang gerührt. Die ausgefallenen Proteine wurden sedimentiert (4300 x g, 15 min, RT) und in einer der Hälfte des Ausgangsvolumens entsprechenden Menge PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) wieder aufgenommen. Die Präzipitation wurde zweimal wiederholt, um die Antikörper anzureichern. Nach der zweiten Wiederholung wurde eine 90 % gesättigte Ammoniumsulfatlösung verwendet. Das erhaltene Sediment wurde in einem kleinen Volumen  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS aufgenommen, in einen Dialyseschlauch überführt und gegen PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei), das zweimal ausgetauscht wurde, 48 h lang bei 4 °C entsalzt. Der gewonnene Antikörper wurde mit 0,1 % Natriumazid versetzt, aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

### 3.7.2 Herstellung von Zelllysaten

Transfizierte, infizierte oder unbehandelte Zellen wurden zur Herstellung von Zelllysaten mit PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) gewaschen. Dazu wurden das Zellkulturmedium abgenommen und 3 ml PBS ( $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -frei) in jede Vertiefung einer 6-Napf-Zellkulturplatte pipettiert. Adhärenz Zellen wurden mit Zellschabern von der Oberfläche gelöst (HeLa), während semiadhärenz Zellen (293) mit Hilfe einer Pipette abgespült wurden. Die Zellsuspension wurde in 15-ml-Röhrchen überführt und 10 min lang bei 350 x g, RT zentrifugiert. Die Sedimente wurden in 200  $\mu\text{l}$  NP40-Lysepuffer, versetzt mit Proteaseinhibitor Cocktail, resuspendiert, in 1,5-ml-Reaktionsgefäße transferiert, 45 s lang gevortext und 20 min lang im Eisbad lysiert. Um die Zellkerne und -trümmer zu entfernen, wurden die Proben 20 min lang bei 13 000 x g und 4 °C in einer Tischzentrifuge zentrifugiert. Der Überstand entspricht dem Lysat.

### 3.7.3 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration

Zur Bestimmung der Proteinkonzentration in einem Zelllysate wurde das *Bicinchoninic Acid (BCA) Kit* zur Proteinbestimmung von Sigma laut Herstellerangaben verwendet. Von dem Zwei-Komponenten-Reagenz wurden 995  $\mu\text{l}$  mit 5  $\mu\text{l}$  der zu bestimmenden Probe gemischt. Eine Proteinlösung mit definierter Konzentration (1 mg/ml BSA) diente als Standard. Auch hiervon wurden 5  $\mu\text{l}$  mit 995  $\mu\text{l}$  des Reagenzes vermischt. Als Leerwert diente ein Ansatz, in dem 5  $\mu\text{l}$  des Lysepuffers eingesetzt wurden. Die Proben wurden 15 min lang bei 60 °C im Heizblock inkubiert. Die Messung der OD erfolgte mit dem Eppendorf BioPhotometer bei 562 nm in Halbmikroküvetten.

### 3.7.4 Azeton-Präzipitation von Proteinen

Die Präzipitation von Proteinen dient zum Einengen des Volumens einer Proteinlösung und der damit verbundenen Erhöhung der Proteinkonzentration. Eine Proteinlösung wurde dafür mit dem doppelten Volumen an eiskaltem Azeton versetzt, gemischt und mindestens 45 min lang bei -20 °C inkubiert. Nach einer Zentrifugation (20 min, 13 000 rpm, 4 °C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Sediment in dem gewünschten Volumen SDS-

Probenpuffer resuspendiert, um auf ein SDS-Gel aufgetragen zu werden und nachfolgend im Western Blot analysiert zu werden (siehe Abschnitte 3.7.9 und 3.7.10).

### **3.7.5 Subzelluläre Fraktionierung mittels Optiprep®-Gradienten**

Die infizierten HeLa-Zellen (aus 3 Näpfen einer 6-Napf-Kulturplatte) wurden dreimal mit Saccharose-Lysepuffer bei 4 °C gewaschen. Dazu wurden sie von dem Napfboden mit einer Pipette abgespült und bei 350 x g 5 min lang bei 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurden die Zellen in 1 ml Lysepuffer resuspendiert und zum Zellaufschluss zehnmal mit einer Spritze aufgezogen und mit Druck durch eine Kanüle (Größe: 26 g) passagiert. Die Zellkerne wurden abzentrifugiert und der Überstand mit Lysepuffer auf ein Gesamtvolumen von 2 ml aufgefüllt. Jeweils 650 µl des Lysats wurden mit dem gleichen Volumen 20, 40 bzw. 60%iger Optiprep-Lösung gemischt und beginnend mit der höchsten Optiprep-Konzentration nacheinander in ein 4-ml-Ultrazentrifugenröhrchen geschichtet. Die Ultrazentrifugation der Gradienten erfolgte bei 350 000 x g 3 h lang bei 4 °C. 150-µl-Fractionen wurden von oben her gesammelt, mit Azeton präzipitiert (siehe Abschnitt 3.7.4), gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abschnitt 3.7.9) und verschiedene Proteine mittels Western Blot nachgewiesen (Abschnitt 3.7.10).

### **3.7.6 Fraktionierung Detergenz-resistenter Membranfraktionen**

Transfizierte oder infizierte 293-Zellen wurden mit 10 ml  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS (pro 3 Vertiefungen einer 6-Napfplatte) durch Auf- und Abpipettieren abgelöst, in 15-ml-Röhrchen überführt und gewaschen (10 min, 350 x g, RT). Das Zellsediment wurde in 200 µl Brij 98-Lysepuffer resuspendiert, gevortext und die Zellen 20 min lang auf Eis lysiert. Dieses Zelllysate wurde mit 600 µl 60%iger Saccharose-Lösung (in NTE1) versetzt, in ein 4-ml-Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt und nacheinander mit 2,5 ml 30%iger und 800 µl 2,5%iger Saccharose-Lösung vorsichtig überschichtet. Die Ultrazentrifugation erfolgte bei 350 000 x g 16 h lang bei 4 °C. Vom Boden des Gradienten her wurden 0,5-ml-Fractionen in 1,5-ml-Reaktionsgefäßen gesammelt und mit Azeton präzipitiert



(siehe Abschnitt 3.7.4). Die Proben wurden nach Versetzen mit 30 µl SDS-Probenpuffer für die weitere Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese (Abschnitt 3.7.9) mit anschließendem Western Blot (siehe Abschnitt 3.7.10) eingesetzt.

### 3.7.7 *Virus-like particle*-Freisetzungstest

Nach 48-stündiger Infektion oder Transfektion wurden die Überstände von Zellen (aus 3 Vertiefungen einer 6-Napf-Kulturplatte pro Ansatz) in 15-ml-Röhrchen gesammelt, zuerst niedertourig (3000 x g, 10 min, 4 °C) und dann durch ein 20 % Saccharosekissen (0,5 ml in NTE2) ultrazentrifugiert (150 000 x g, 2 h, 4 °C). Das Sediment wurde in 20 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und bis zur Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot bei -80 °C gelagert. Die Zellen eines Napfes wurden wie unter Punkt 3.7.2 beschrieben lysiert und dienten als Expressionskontrolle der nachzuweisenden Proteine.

### 3.7.8 Co-Immunpräzipitation

HeLa-Zellen wurden 48 h nach der Transfektion mit PBS (Ca<sup>2+</sup>- und Mg<sup>2+</sup>-frei) gewaschen, mit Hilfe eines Zellschabers vom Napfboden gelöst, in 15-ml-Röhrchen überführt, zentrifugiert (5 min, 350 x g, RT) und in 1 ml kaltem RIPA-Lysepuffer, der mit 10 mM NEM und 5 mg/ml Pepstatin versetzt war, 10 min lang auf Eis lysiert. 4 h vor der Lyse wurde das Kulturmedium mit 10 µM MG132-Proteasominhibitor versetzt (1 µl einer 100 mM Vorratslösung [in DMSO] in 1 ml frischem MEM pro Napf), um transiente Ubiquitin-Modifikationen von Proteinen zu stabilisieren (Heissmeyer & Rao, 2004). Je Ansatz wurden Zellen aus 6 Näpfen einer 6-Napfplatte eingesetzt. Der Proteingehalt des durch Zentrifugation (15 min, 13 000 rpm, 4 °C) von Zelltrümmern befreiten Lysats wurde bestimmt (siehe Punkt 3.7.3). Die Lysate wurden, falls nötig, auf eine einheitliche Proteinkonzentration eingestellt und gleiche Proteinmengen in ein frisches 1,5-ml-Reaktionsgefäß überführt. Die Ausbildung der Antigen-Antikörper-Komplexe erfolgte langsam rotierend innerhalb von 1 bis 2 h bei 4 °C mit 5 µl des Maus-α-HA-Antikörpers (F-7). Nachfolgend wurden 25 µl Protein-A-Sepharose zu jedem Ansatz pipettiert und die Ansätze zur Präzipitation

(Bindung der Antigen-Antikörper-Komplexe an die Sepharose-Kügelchen) nochmals 1 h lang unter den gleichen Bedingungen inkubiert. Die Immunpräzipitate wurden 4-mal mit 1 ml kaltem Triton-Lysepuffer gewaschen (30 s, 13 000rpm, 4 °C). Die in SDS-Probenpuffer aufgenommenen Sedimente wurden für SDS-Gelelektrophorese (siehe Abschnitt 3.7.9) und Western Blot (Abschnitt 3.7.10) verwendet.

### 3.7.9 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese ist eine Methode zur Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe in einer Gelmatrix durch Anlegen eines elektrischen Feldes. Die Anwesenheit von SDS sorgt für eine negative Ladung und Entfaltung der dreidimensionalen Tertiärstruktur aller Proteine. Ihre Mobilität innerhalb des Gels hängt maßgeblich von ihrer relativen Größe ab.

Ein vertikales Gel wurde in einer Apparatur zwischen zwei Glasplatten gegossen. 4/5 der Gelkammer wurden mit dem Gemisch für das Trenngel befüllt, vorsichtig mit Isopropanol überschichtet und zur Polymerisation etwa 30 bis 45 min lang bei RT stehen gelassen. Das überschüssige Isopropanol wurde sorgfältig von dem verfestigten Gel entfernt und mit der Mischung für das Sammelgel überschichtet. Zur Erzeugung von Probenaschen diente ein Kamm, der vor dem Polymerisieren in das noch flüssige Gel gesteckt wurde.

Ansatz für ein Trenngel:

Acrylamidkonzentration \ Komponente	10 %	12 %	15 %
1,5 M Tris-HCl, pH 8,7	8,0 ml	8,0 ml	8,0 ml
H <sub>2</sub> O	12,9 ml	10,8 ml	7,2 ml
30 % Acrylamid	10,6 ml	12,8 ml	16,0 ml
10 % APS	280 µl	280 µl	280 µl
20 % SDS	160 µl	160 µl	160 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Ansatz für ein Sammelgel:

1 M Tris-HCl, pH 6,8	1,25 ml
H <sub>2</sub> O	6,0 ml
30 % Acrylamid	1,3 ml
10 % APS	100 µl
20 % SDS	50 µl
TEMED	10 µl

Nach der Polymerisation des Sammelgels wurde das obere und untere Kompartiment der Elektrophoreseapparatur mit Laufpuffer befüllt und die Geltaschen gespült. Die mit SDS-Probenpuffer versetzten Proben wurden, wenn nicht anders angegeben, 5 min lang bei 100 °C gekocht, 5 s lang in der Tischzentrifuge zentrifugiert und die Proben in die Probentaschen des Gels pipettiert. Der Gellauf erfolgte in der Regel bei 15 mA/Gel ü. N..

### 3.7.10 Western Blot

Die Methode des Western Blots dient zum spezifischen Nachweis von Proteinen nach Auftrennung in Acrylamidgelen unter Verwendung von proteinspezifischen Primärantikörpern und Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörpern.

Die aufgetrennten Proteine, die sich in dem SDS-Gel befanden, wurden auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Um dies zu erreichen, wurde eine Blot-Apparatur verwendet, an die ein elektrischer Strom angelegt wurde. Dabei wird die negative Ladung der Proteine ausgenutzt: die Proteine wandern in dem elektrischen Feld in Richtung des Pluspols (Anode) aus dem Gel heraus und binden an die zwischen Anode und Gel befindliche Nitrozellulosemembran.

Zunächst wurden dafür zwei auf die Größe des Gels zurecht geschnittene Whatman-Papiere in Kathodenpuffer getränkt und luftblasenfrei auf die als Kathode fungierende Graphitplatte der Blot-Apparatur gelegt. Auf diese folgten nacheinander ebenfalls luftblasenfrei das Acrylamidgel (äquilibriert in Kathodenpuffer), die Nitrozellulosemembran (äquilibriert in 30 mM Anodenpuffer) sowie

zwei in 30 mM Anodenpuffer und zwei in 300 mM Anodenpuffer getränkte Whatman-Papiere. Die Apparatur wurde mit einem Deckel, der eine als Anode wirkende Graphitplatte enthielt, verschlossen. Der Proteintransfer erfolgte bei 110 mA innerhalb von 1 h 15 min.

Anschließend wurde die Membran zur Absättigung freier unspezifischer Proteinbindungsstellen 20 min lang in Milchpuffer auf einem Kippschwenker inkubiert. Dem folgten die jeweils einstündigen Inkubationen mit dem Primärantikörper und dem Meerrettich-Peroxidase-gekoppelten Sekundärantikörper, die in Milchpuffer verdünnt wurden. Nach jeder Inkubation wurde ungebundener Antikörper durch dreimaliges Waschen der Membran mit  $\text{Ca}^{2+}$ - und  $\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS, das mit 0,05 % Tween 20 (v/v) versetzt war, je 10 min lang entfernt. Wenn mehrere Proteine auf einer Membran nachgewiesen werden sollten, wurde diese entweder zerschnitten oder die Färbung erfolgte zunächst nacheinander mit den Primärantikörpern und dann ebenfalls nacheinander mit den Sekundärantikörpern. Nach dem letzten Waschen erfolgte eine einminütige Behandlung mit 2 ml ECL-Reagenz, einem Peroxidase-substrat, bei dessen Umsetzung Chemilumineszenz entsteht. Ein Röntgenfilm wurde auf die Membran gelegt und nach variablen Zeiträumen entwickelt. An Protein gebundene Antikörper wurden als diskrete Banden (Schwärzung des Films) sichtbar.

In einigen Fällen wurden zur groben Quantifizierung der Proteinmengen die Filme digitalisiert und mit der AIDA-Software von Raytest ausgewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1.1 Untersuchung zur Variabilität von M-Proteinen in MV Wildtyp- und Vakzinestämmen

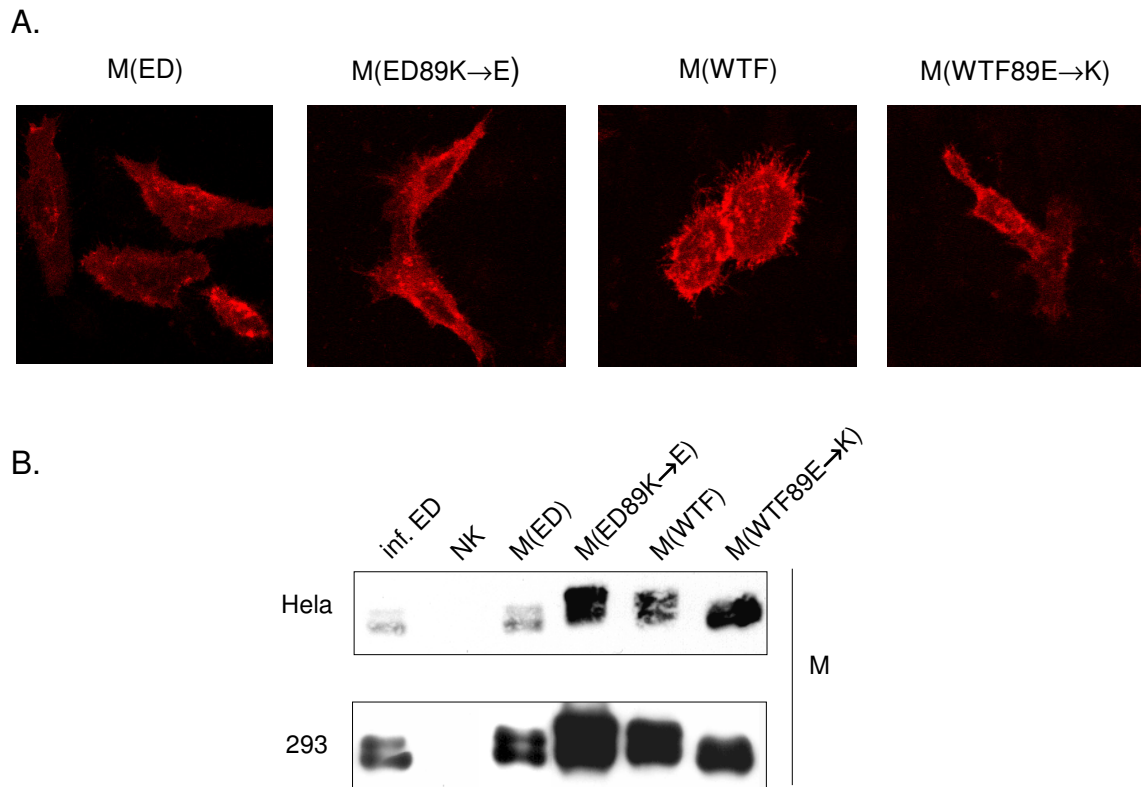
Die im Folgenden dargestellten Versuche dienten zur näheren Untersuchung der möglichen Unterschiede des M-Proteins des Vakzinestamms ED und des Wildtypstamms WTF hinsichtlich ihrer intrazellulären Verteilung, ihrer Antigenität und der Bedeutung der Aminosäure an Position 89, die jeweils für Vakzine- und Wildtypstämme hoch konserviert ist. M-Proteine von Vakzinestämmen wie ED weisen an dieser Position die Aminosäure Lysin (K) auf, wohingegen bei Wildtypstämmen dort die Aminosäure Glutaminsäure (E) enthalten ist.

### 4.1.2 Transiente Expression und intrazelluläre Verteilung von M-Proteinen unterschiedlichen Ursprungs in transient M-Protein exprimierenden Zellen

HeLa-Zellen wurden mit den Plasmiden transfiziert, die das M-Protein des Vakzinestamms ED (M(ED)), des Wildtypstamms WTF (M(WTF)) oder Punktmutanten beider Proteine, die zu einem Austausch der Aminosäure an Position 89 führen M(ED89K→E) und M(WTF89E→K) kodieren. Bei den Punktmutanten entspricht die ausgetauschte Aminosäure der des M-Proteins des jeweils anderen Virus. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Die Expression der M-Proteine wurde mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper MAB8910 nachgewiesen (Abb. 4.1 (A)). Dabei zeigte sich, dass in allen Fällen M-Protein exprimiert wurde und alle Proteine mit dem Antikörper reagierten. Die intrazelluläre Verteilung war hauptsächlich zytoplasmatisch, jedoch konnte ein Teil des Proteins an der Plasmamembran detektiert werden. Vakzine- und Wildtyp-Proteine wiesen keine Unterschiede auf. Ein Einfluss der Aminosäure an Position 89 auf die Proteinexpression und die intrazelluläre Lokalisation kann ausgeschlossen werden.

293- und HeLa-Zellen wurden transfiziert, um die verschiedenen M-Proteine M(ED), M(ED89K→E), M(WTF) bzw. M(WTF89E→K) zu exprimieren. Als

Positivkontrolle wurden Zellen verwendet, die mit dem ED-Virus mit einer MOI von 0,5 infiziert worden waren. Nicht transfizierte oder infizierte Zellen dienten als Negativkontrolle. 24 h nach Transfektion oder Infektion wurden die Zellen lysiert und die gewonnenen Extrakte gelelektrophoretisch aufgetrennt. Der Nachweis der M-Proteine erfolgte mittels Western Blot unter Verwendung des Antikörpers MAB8910. Der bereits zuvor beschriebene Unterschied im Migrationsverhalten der M-Proteine von Vakzinestämmen gegenüber denen verschiedener Wildtypstämme (Rima, 1983, Rima et al., 1995a, Rima et al., 1979) zeigte sich auch für die Plasmid-exprimierten Proteine M(ED) und M(WTF) (Abb. 4.1(B)). Während M(ED) eine scheinbare Größe von 37 kDa aufweist, hat M(WTF) eine von 39 kDa. Der Austausch der Aminosäure 89 von K zu E bewirkte eine Veränderung des Migrationsverhaltens im SDS-Gel. Die Aminosäure K erhöht die Mobilität im Gel, während ein E an dieser Stelle die Mobilität verringert. Außerdem migrierten alle M-Proteine unabhängig ihres Ursprungs und der Aminosäure an Position 89 als Doppelbanden.

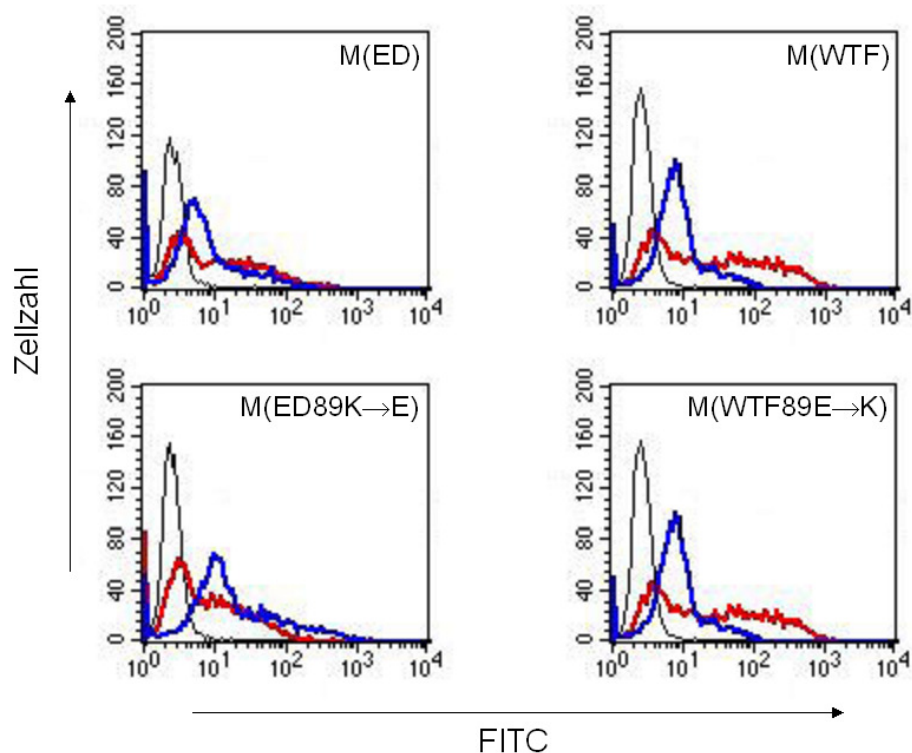


**Abbildung 4.1: Verteilung transient exprimierter MV M-Proteine mittels Immunfluoreszenz und Nachweis von M-Proteinen im Western Blot.** (A) HeLa-Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit den entsprechenden pCG-Plasmiden fixiert, permeabilisiert und die Expression des M-Proteins mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper MAB8910 nachgewiesen. (B) HeLa- und 293-Zellen wurden 24 h vor der Lyse mit den M-Plasmiden transfiziert, ED-infiziert (inf. ED) oder unbehandelt gelassen (NK). Die Proteine wurden durch SDS-PAGE (12 % Acrylamid) aufgetrennt. Von den HeLa-Zelllysaten wurden 20  $\mu$ g Gesamtprotein pro Gelspur und von den 293-Zellen 50  $\mu$ g aufgetragen und M-Proteine im Western Blot unter Verwendung des  $\alpha$ -M-Antikörpers MAB8910 nachgewiesen.

#### 4.1.3 Einfluss der Aminosäure an Position 89 auf die Antigenität in transfizierten Zellen

In durchflusszytometrischen Analysen wurde die Expression der unterschiedlichen M-Protein-Konstrukte untersucht. HeLa-Zellen wurden mit den jeweiligen Plasmiden transfiziert und 24 h nach der Transfektion wurde das M-Protein gefärbt. Die Zellen eines Transfektionsansatzes (in 6-Napf-Kulturplatten) wurden zur Färbung mit zwei verschiedenen  $\alpha$ -M-Antikörpern (MAB8910 und B347) und der Isotypkontrolle ( $\alpha$ -VSV-G) aufgeteilt. Der kommerziell erhältliche monoklonale Antikörper MAB8910 erkannte M(ED), M(WTF) und die beiden Punktmutanten (Abb. 4.2). Im Gegensatz dazu detektierte der im Institut für

Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg generierte monoklonale Antikörper B347 lediglich die zwei ED-basierten M-Proteine M(ED) und M(ED89K→E). Die WTF-basierten M-Proteine M(WTF) und M(WTF89E→K) wurden durch diesen Antikörper nicht oder nur kaum erkannt. Dieser Versuch zeigt, dass es Unterschiede in der Antikörpererkennung des M-Proteins des Vakzinestamms ED und dem des Wildtypstamms WTF gibt. Diese Beobachtung lässt sich aber nicht durch die Differenz beider Proteine an Aminosäureposition 89 erklären, da ein Austausch dieses Aminosäurerestes keine Veränderung in der Antigenität verursachte.



**Abbildung 4.2: Durchflusszytometrische Analyse M-Protein exprimierender HeLa-Zellen.** Die Zellen wurden 24 h nach der Transfektion mit den α-M-Antikörpern MAB8910 (rote Linie) oder B347 (blaue Linie) gefärbt. Ein Isotyp (α-VSV-G) diente als Kontrolle (schwarze Linie).



#### 4.1.4 Antigenität von Wildtyp- und Vakzine-M-Proteinen in infizierten Zellen

M-Protein wurde mit den M-spezifischen Antikörpern MAB8910 oder B347 in persistent mit MV ED- oder MV WTF-infizierten sowie uninfizierten BJAB-Zellen gefärbt. Zusätzlich diente der Nachweis des H-Proteins (K83) als Infektionskontrolle und die Färbung mit dem  $\alpha$ -VSV-G-Antikörper als Isotypkontrolle (Abb. 4.3(A)).

Die Infektionskontrolle ( $\alpha$ -H) bestätigt, dass beide persistent infizierten Zelllinien zu mehr als 90 % infiziert waren. Das gleiche zeigt die Färbung mit dem M-spezifischen Antikörper MAB8910, die bestätigt, dass die Zellen M-Protein exprimieren. Im Gegensatz dazu wurde das M-Protein des Wildtypstamms in den persistent WTF-infizierten Zellen durch den Antikörper B347 nicht erkannt. 53 % der persistent ED-infizierten BJAB-Zellen wurden mit B347 gefärbt. Demgegenüber stehen weniger als 0,5 % positive persistent WTF-infizierte Zellen (Tabelle 4-1).

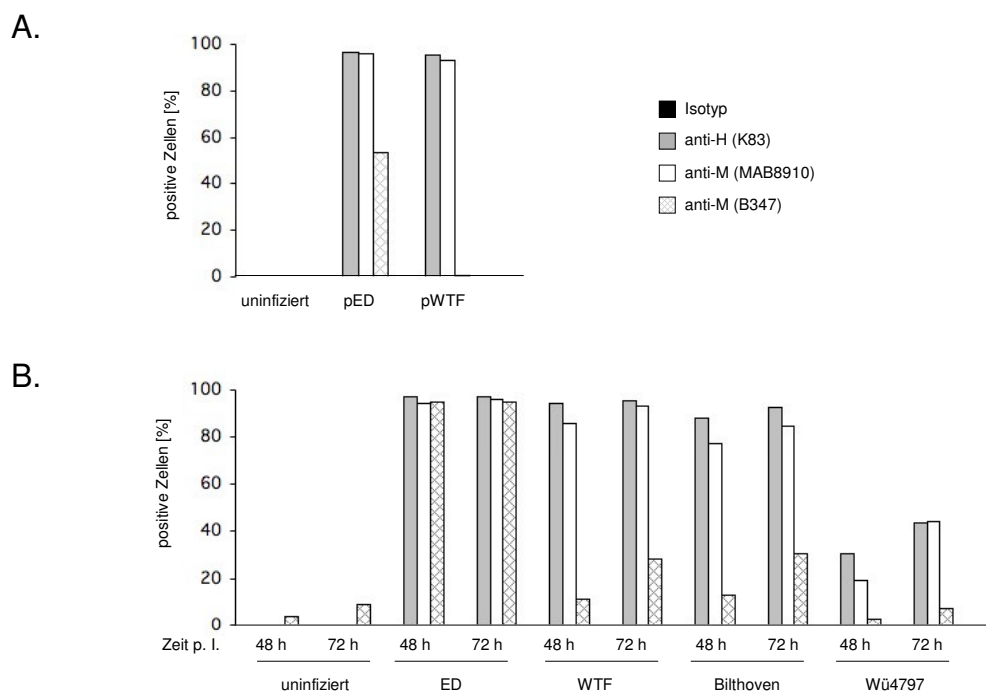
In einem weiteren Experiment wurden BJAB-Zellen lytisch mit dem Vakzinstamm ED oder den Wildtypstämmen WTF, Bilthoven beziehungsweise Wü4797 mit einer MOI von 2 infiziert. 48 und 72 h nach der Infektion wurden die Zellen wie oben beschrieben mit den M-spezifischen Antikörpern MAB8910 und B347 gegen das M-Protein gefärbt (Abb. 4.3(B)). Als Kontrollen dienten der Nachweis des H-Proteins (K83; für die Infektion) und eine Isotyp-Färbung ( $\alpha$ -VSV-G).

Wie in den persistent infizierten Zellen diente die Färbung des H-Proteins mit dem H-spezifischen Antikörper K83 als Infektionskontrolle (Abb. 4.3(A)).

Im Fall von ED, WTF und Bilthoven waren über 90 % der Zellen infiziert, wie mit dem  $\alpha$ -H-Antikörper und dem  $\alpha$ -M-Antikörper MAB8910 nachgewiesen wurde. Die Zellen, die mit Wü4797 infiziert worden waren, wiesen insgesamt weniger H- und MAB8910-positive Zellen auf (etwa 44 %).

Die Färbung mit dem M-spezifischen Antikörper B347 in den ED-infizierten Zellen war ebenso effizient wie für MAB8910 und den H-Nachweis. Der Antikörper B347 erkannte jedoch nur 30 bzw. 28 % der WTF- oder Bilthoven-

infizierten Zellen als positiv. Auch in den Wü4797-infizierten Zellen zeigte sich eine deutlich verringerte Reaktivität des M-Proteins mit dem Antikörper B347 (weniger als 10 %). Wie in den persistent infizierten Zellen erkannte dieser Antikörper die Wildtyp-M-Proteine der Stämme WTF, Bilthoven und Wü4797 nur ineffizient (Abb. 4.3(B) und Tabelle 4-2).



**Abbildung 4.3: Unterschiede in der Antigenität von MV Vakzine- und Impfstämmen.** Die Expression von H (K83) oder M (MAB8910 bzw. B347) wurde in BJAB-Zellen nachgewiesen, die persistent mit ED (pED) oder WTF (pWTF) (A) oder lytisch für 48 oder 72 h mit ED, WTF, Bilthoven oder Wü4797 (je MOI 2) infiziert waren (B). Die Ansätze der lytisch infizierten Zellen wurden nach der Infektion mit einem fusionsinhibitorischen Peptid versetzt. Ein Maus-IgG diente als Isotypkontrolle.

Tabelle 4-1: Quantitative Analyse der im Diagramm in Abb. 4.3(A) dargestellten Ergebnisse

Zelltyp \ AK	BJAB	BJABpED	BJABpWTF
Iso	0	0,1	0,1
H (K83)	0	96,8	95,2
M (MAB8910)	0,1	96,2	93,4
M (B347)	0,1	53,2	0,4

Tabelle 4-2: : Quantitative Analyse der im Diagramm in Abb. 4.3(B) dargestellten Ergebnisse

Zelltyp \ AK	NK		inf. ED		inf. WTF		inf. Bilthoven		inf. Wü4797	
	48	72	48	72	48	72	48	72	48	72
Iso	0,1	0	0,1	0,2	0,1	0	0,1	0	0	0,1
H (K83)	0,2	0,01	97,2	97,1	94,4	95,2	87,9	92,8	30,8	43,4
M (MAB8910)	0,2	0,1	94,4	95,9	85,8	93,4	77,6	84,7	19,0	44,0
M (B347)	4,1	9,1	95,2	94,8	11,1	28,3	13,0	30,5	2,8	7,6

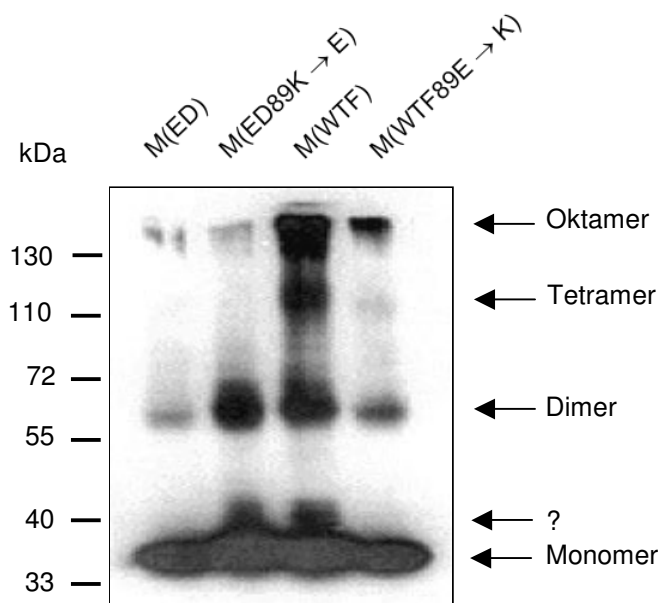
## 4.2 Eigenschaften des MV M-Proteins

### 4.2.1 Die Fähigkeit von M-Proteinen zur Homooligomerisierung

HeLa-Zellen wurden zur Expression der M-Proteine von ED und WTF sowie ihrer Punktmutanten an der Position 89 transfiziert und 24 h später lysiert. Von den Zelllysaten wurden etwa gleiche Mengen M-Protein auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen. Die Proben wurden im Gegensatz zum herkömmlichen Verfahren vor dem Auftragen auf das SDS-Gel nicht gekocht. Auf diese Weise bleiben Sekundärstrukturen und Protein-Proteininteraktionen bestehen. Im Western Blot wurden MAB8910-reaktive Proteinkomplexe nachgewiesen (Abb. 4.4).

Dabei ließen sich für alle vier der untersuchten M-Proteine oligomere Komplexe der zu erwartenden Größe detektieren, bei denen es sich um Mono-, Di-, Tetra- und Oktamere der M-Proteine handelte. Insbesondere für die Dimere waren die zuvor beschriebenen Unterschiede in der elektrophoretischen Mobilität deutlich erkennbar (vgl. Abb. 4.1(B) und 4.4). Da es sich bei den hochmolekularen

Komplexen hinsichtlich der Größe (in kDa) um jeweils Vielfache der Größe des monomeren M-Proteins handelt, ist davon auszugehen, dass es sich um Homooligomere handelt. Auffällig ist weiterhin, dass die Banden der Monomere und nicht als diskrete Banden erschienen, sondern einen „Schmier“ nach oben zeigten. Dies war bei M(WTF) und M(ED89K→E) besonders deutlich (in Abb. 4.4 markiert durch ?).

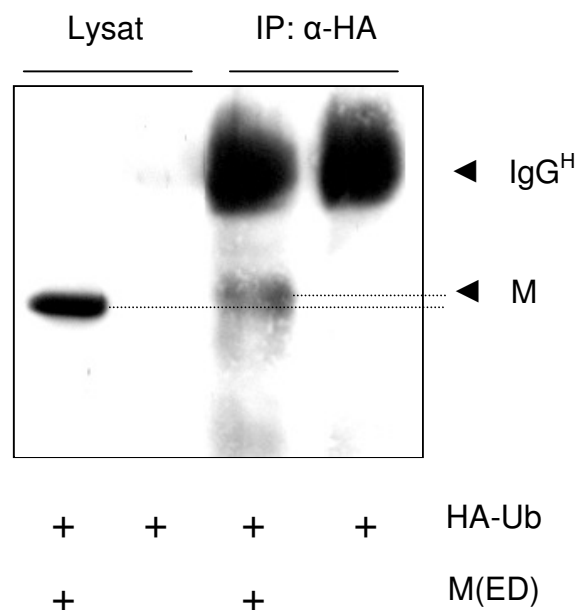


**Abbildung 4.4: Homooligomerisierung von M-Proteinen.** HeLa-Zellen wurden zur Expression der M-Proteine M(ED), M(ED89K→E), M(WTF) bzw. M(WTF89E→K) transfiziert und nach 24 h mit NP-40-Lysepuffer lysiert. Etwa gleiche Mengen an M-Protein (20-60 µg) wurden pro Probe auf ein 10%iges SDS-Gel aufgetragen ohne sie zuvor zu kochen und elektrophoretisch aufgetrennt. Im Western Blot erfolgte der M-Protein-Nachweis mit dem Antikörper MAB8910.

#### 4.2.2 Nachweis der posttranslationalen Ubiquitin-Modifikation des M-Proteins

Um zu untersuchen, ob das M-Protein posttranslational Ubiquitin-modifiziert wird, wurden HA-gekoppeltes Ubiquitin (HA-Ub) und M(ED) in HeLa-Zellen koexprimiert. Als Negativkontrolle dienten Zellen, die nur HA-Ub exprimierten. 48 h nach der Transfektion wurden pro Ansatz die Zellen aus 6 Näpfen einer 6-Napfzellkulturplatte mit RIPA-Lysepuffer lysiert. Dieser war mit mehreren Proteaseinhibitoren versetzt, unter ihnen NEM, ein Sulfhydrylgruppenvernetzendes Agens, das als Inhibitor deubiquitinierender Enzyme wirkt. 4 h vor der Lyse erfolgte eine Behandlung der Zellen mit 10 µM MG132, einem Proteasom-Inhibitor, der zur Stabilisierung transienter Ubiquitin-Modifikationen

verwendet wird (Heissmeyer & Rao, 2004). Je 450 µg Gesamtprotein pro Lysat wurden für die Immunpräzipitation mit dem  $\alpha$ -HA-Antikörper eingesetzt (vgl. Abschnitt 3.7.8). Die Immunpräzipitate wurden parallel mit einer nicht-präzipitierten Lysatkontrolle gelelektrophoretisch in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Im sich anschließenden Western Blot wurde M-Protein nachgewiesen (siehe Abb. 4.5). Dabei dienten die nicht behandelten HA-Ubiquitin- und M-exprimierenden Proben als Expressionskontrollen für das M-Protein. Die Abbildung 4.4 zeigt, dass der  $\alpha$ -HA-Antikörper ein mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper MAB8910-reaktives Protein aus dem Lysat der HA-Ubiquitin- und M(ED)-exprimierenden Zellen kopräzipitierte. Dies bestätigt, dass das M-Protein zumindest transient ubiquitiniert ist. Da das präzipitierte Protein kaum größer erscheint als das im unbehandelten Lysat nachweisbare M-Protein, handelt es sich wahrscheinlich um eine Mono-Ubiquitinierung.



**Abbildung 4.5: Ubiquitin-Modifikation von M(ED).** M-Protein wurde in Zelllysaten oder  $\alpha$ -HA-Immunpräzipitaten aus HeLa-Zellen mittels Western Blot nachgewiesen, die zur Expression von HA-gekoppeltem Ubiquitin allein oder in Kombination mit dem M-Protein transfiziert wurden. 44 h nach der Transfektion wurden die Zellen 4 h lang mit 10 µM MG132 behandelt. Die Auftrennung erfolgte in einem 15%igen SDS-Gel.

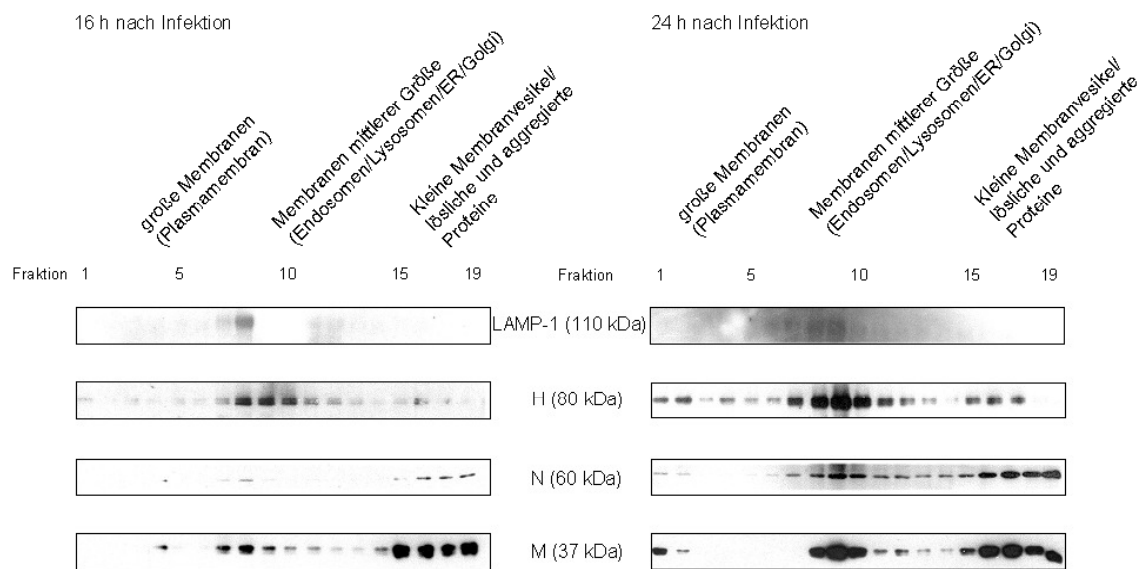
### 4.2.3 Assoziation von MV-Proteinen mit Membranen unterschiedlicher Größe

In Optiprep®-Dichtegradienten können zelluläre Membranen durch Dichtegradienten-Ultrazentrifugation nach Größe aufgetrennt werden. Diese Methode ermöglicht es, zu untersuchen, welche der MV-Proteine mit großen Membranen, also den Zytoplasmamembranen, den Membranen mittlerer Größe oder kleinen Membranvesikeln assoziiert bzw. löslich im Zytoplasma vorliegen. Zu den Zellorganellen mittlerer Größe zählen insbesondere frühe und späte Endosomen, Lysosomen, das ER sowie der Golgi-Apparat. Da die Gradientenfractionen von oben her gesammelt wurden, sind die ersten Fraktionen die mit der geringsten Dichte. Sie enthielten die Zytoplasmamembranen. In den zuletzt gesammelt Fraktionen des Gradienten mit der höchsten Dichte befanden sich die Membranen der kleinen Organellen, die löslichen und aggregierten Proteine.

Die mit einer MOI von 0,5 mit ED-Virus infizierten HeLa-Zellen wurden 16 und 24 h nach der Infektion in Saccharosepuffer durch Passagieren durch eine Kanüle lysiert und von den Zellkernen befreit. Gleiche Lysatmengen wurden mit den Lösungen unterschiedlicher Dichte gemischt, als dreistufiger Gradient in ein Zentrifugenröhrchen geschichtet und ultrazentrifugiert. Die gesammelten Fraktionen wurden nach der Azeton-Präzipitation zur Konzentrierung der Proteine gelelektrophoretisch in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Im nachfolgenden Western Blot wurden die M-, N- und H-Proteine des MV nachgewiesen. Als Marker-Protein für die intermediären Fraktionen diente der Nachweis von Lamp-1, das in späten Endosomen und Lysosomen lokalisiert ist (Abb. 4.6). Der Versuch zeigte, dass dieses Protein sowohl 16 als auch 24 h nach der Infektion erwartungsgemäß in den mittleren Fraktionen des Gradienten zu finden war (Fraktionen 7-8 bzw. 7-9). Das H-Protein war 16 h nach der Infektion mit den Membranen aller Größen (Fraktionen 1, 7-12 und 16) assoziiert (Abb. 4.6, linke Seite), vorwiegend jedoch mit denen der mittleren Größe. In den anderen Fraktionen war nur ein kleiner Anteil detektierbar. Dagegen lag das N-Protein vorwiegend löslich, aggregiert oder an kleine Membranen gebunden vor (Fraktionen 16-19). Eine geringe Menge ließ sich in

der mittleren Fraktion 8 nachweisen. Auch die überwiegende Menge des M-Proteins fand sich in den Fraktionen hoher Dichte (Fraktionen 15-19). Im Gegensatz zum N-Protein war es außerdem mit den Lamp-1-positiven Membranen intermediärer Größe assoziiert (Fraktionen 7-11).

Insgesamt war im zeitlichen Infektionsverlauf ein Anstieg der Expression viraler Proteine feststellbar, ebenso ein Transport der Virusproteine an die Zytoplasmamembran. 24 h nach der Infektion waren alle MV-Proteine mit der Zytoplasmamembran assoziiert (Fraktionen 1 und 2), dem Ort der Viruspartikel-Morphogenese (Abb. 4.6, rechte Seite). Alle untersuchten Proteine konnten auch in den mittleren, Lamp-1-positiven Fraktionen, dabei besonders in den Fraktionen 7-9 und in den Fraktionen, die die kleinen Membranvesikel, löslichen oder aggregierten Proteine enthielten, detektiert werden. Die Hauptmenge an H-Protein enthielten die Fraktionen intermediärer Größe. N- und M-Proteine waren vorwiegend löslich, aggregiert oder mit kleinen Vesikeln assoziiert. Im Vergleich zwischen M- und N-Protein war der Anteil des M-Proteins, der mit den Membranen mittlerer Größe flotierte leicht erhöht. Das Transmembranprotein H wird von Ribosomen am rauen ER synthetisiert und liegt von Beginn an mit Membranen assoziiert vor. Interessanterweise interagiert das periphere Membranprotein M schon relativ früh nach der Infektion mit Membranen intermediärer Größe.



**Abbildung 4.6: Assoziation von MV-Proteinen mit Membranen unterschiedlicher Größe.** HeLa-Zellen wurden mit MV ED (MOI 0,5) infiziert und 16 oder 24 h nach der Infektion mit Saccharose-Lysepuffer lysiert. Anschließend wurden die Lysate in dreistufigen Optiprep®-Dichtegradienten durch Ultrazentrifugation fraktioniert, um die zellulären Membranen entsprechend ihrer Größe aufzutrennen. Die in den Fraktionen enthaltenen Proteine wurden in einem 12%igen SDS-Gel aufgetrennt. Der Proteinnachweis im Western Blot erfolgte unter Verwendung folgender Antikörper:  $\alpha$ -Lamp-1 (25),  $\alpha$ -MV-H (H45),  $\alpha$ -MV-N (F227) und  $\alpha$ -M (MAB8910). Die Größe der Proteine ist in kDa angegeben.

#### 4.2.4 Assoziation von MV-Proteinen mit Detergenz-resistenten Membranfraktionen

In früheren Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass in infizierten HeLa-Zellen die neu entstehenden MV-Partikel vorzugsweise aus CD55-haltigen DRMs freigesetzt werden (Manie et al., 2000, Vincent et al., 2000). In der vorliegenden Arbeit wurde geprüft, ob dies für die ebenfalls humane Fibroblastenzelllinie 293 zutrifft. Darüber hinaus wurde die Fähigkeit des ED M-Proteins zur Assoziation mit DRMs untersucht. Dazu wurde es in Abwesenheit anderer MV-Proteine in den Zellen exprimiert oder in Kombination mit dem homologen beziehungsweise dem heterologen F-Protein der Stämme ED oder WTF bzw. mit dem homologen H-Protein des MV-Stamms ED. Das Ziel dieser Versuche war es, einen möglichen Einfluss der Glykoproteine F und H auf die Assoziation des M-Proteins mit den DRMs feststellen zu können. Vom F-Protein ist bekannt, dass es mit DRM-Fraktionen assoziiert, da es palmitoyliert ist

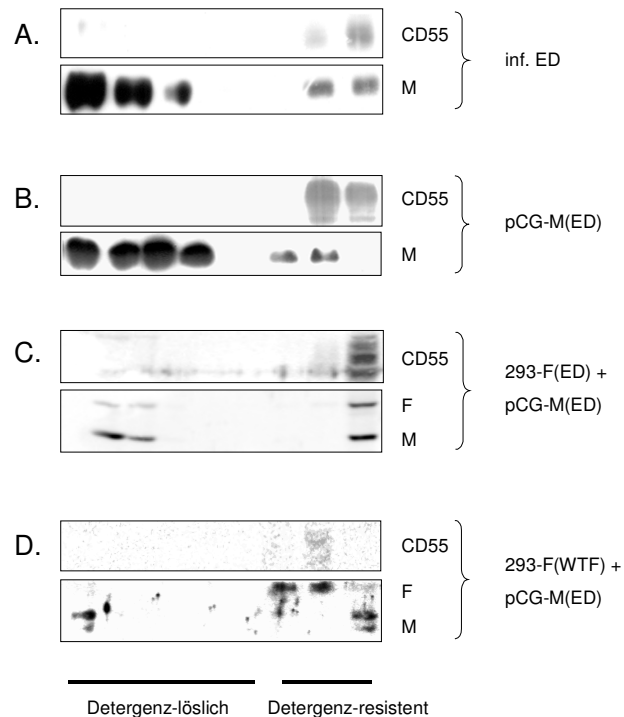


(Caballero et al., 1998). Dagegen konnte gezeigt werden, dass das H-Protein nur in Anwesenheit des F-Proteins eine DRM-Assoziation aufweist.

293-Zellen wurden mit dem Vakzinestamm ED (MOI 0,5) für 24 h infiziert oder 293-Zellen, 293-F(ED)-Zellen, 293-F(WTF)- oder 293-H(ED)-Zellen wurden für 48 h mit dem pCG-M(ED)-Plasmid transfiziert. Die beiden Zelllinien 293-F(ED) und 293-F(WTF) exprimierten das jeweilige F-Protein stabil und die Zelllinie 293-H(ED) das H-Protein des Stamms ED.

In Abbildung 4.7(A) (untere Reihe) ist erkennbar, dass etwa 10 % des M-Proteins in den DRM-Fraktionen des Gradienten vorliegen, während der Rest in den Fraktionen vorliegt, deren Proteine zytoplasmatisch sind oder mit dem Detergenz Brij89 aus Membranen herausgelöst werden können. Ein vergleichbares Ergebnis weist auch der Western Blot in Abbildung 4.7(B) auf. Das in 293-Zellen überexprimierte M-Protein ist ebenfalls zu etwa 10 % in den DRM-Fraktionen vorhanden. Der Anteil an M-Protein erhöht sich um etwa das Vierfache, sobald die Zellen zusätzlich homologes (F(ED)) oder heterologes F-Protein (F(WTF)) exprimieren (Abb. 4.7(C) und (D), jeweils untere Reihe), wobei der Ursprung des F-Proteins keinen Einfluss auf die verstärkte DRM-Rekrutierung des M-Proteins hat.

In allen Versuchen wurde parallel zu den MV-Proteinen CD55 nachgewiesen, das als Marker für DRMs dient (Abb. 4.7(A-D), obere Reihe). Unter geeigneten Auftrennungsbedingungen während der SDS-PAGE waren auch in diesen Versuchen die bereits in Abbildung 4.1(B) gezeigten Doppelbanden des M-Proteins erkennbar (Abb. 4.7(A) und (D)). Allerdings ließ sich keine präferenzielle Lokalisation eines der beiden M-Proteine in den Detergenz-löslichen oder unlöslichen Fraktionen reproduzierbar nachweisen.



**Abbildung 4.7: Assoziation von MV-Proteinen mit Detergenz-resistenten Membranfraktionen.** Lysate von 293-Zellen, die mit MV ED (MOI 0,5; 24 h) infiziert wurden (A), oder 293- (B), 293-F(ED)- (C), 293-F(WTF)-Zellen (D), die mit pCG-M(ED) transfiziert wurden (48 h), wurden einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation in einem dreistufigen Gradienten unterzogen, die Fraktionen, gelelektrophoretisch aufgetrennt (15 % Acrylamid) und im Western Blot auf des Vorkommen von M und CD55 (als Marker für Detergenz-resistente Membranen) untersucht. In C und D wurde weiterhin F nachgewiesen.

#### 4.2.5 Die Fähigkeit von MV-Proteinen zur Freisetzung von *Virus-like particles* aus transfizierten Zellen

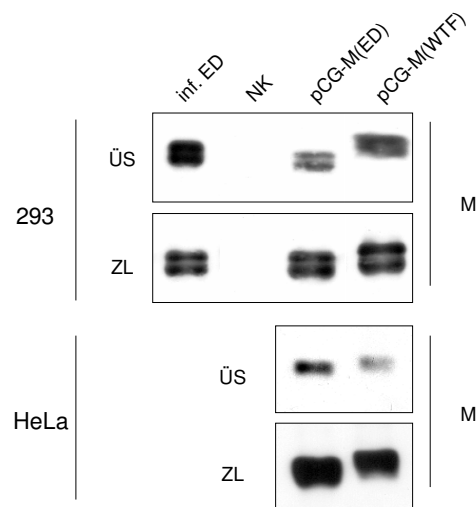
Nach dem Befund, dass eine Fraktion des M-Proteins ebenso wie seine funktionellen Orthologe anderer Viren, mono-ubiquitiniert und mit DRMs assoziiert sind (Abschnitte 4.2.2 und 4.2.4), wurde getestet, ob es auch die Fähigkeit zur Freisetzung von sogenannten *Virus-like particles* (VLPs) aus transfizierten Zellen besitzt. Bei VLPs handelt es sich um Plasmamembranvesikel, die von Zellen, die lediglich einzelne Virusproteine exprimieren, abgeschnürt werden. Dieser Prozess entspricht funktionell dem Knospen viraler Partikel, in dem die viralen Proteine zusammen mit zellulären Faktoren als treibende Kraft dieses Vorgangs fungieren.

Für die Experimente wurden Überstände von 293- und HeLa-Zellen gesammelt und analysiert, die mit den Plasmiden pCG-M(ED) oder pCG-M(WTF) für 48 h transfiziert worden waren. Dies geschah durch niedertourige und anschließende Ultrazentrifugation der Überstände durch ein 20%iges Saccharosekissen. Als Kontrollen dienten MV ED-infizierte (MOI von 0,5) und nicht-infizierte oder transfizierte 293-Zellen, deren Überstände in gleicher Weise aufbereitet wurden. Die erhaltenen Sedimente wurden zusammen mit 1/60 des entsprechenden Zelllysats, das als Expressionskontrolle diente, in 15%igen SDS-Gelen elektrophoretisch aufgetrennt. Nach gelelektrophoretischer Auftrennung wurden im Immunoblot die Proteine M und H nachgewiesen. Tatsächlich konnten sowohl das M-Protein des Vakzinestamms ED als auch des Wildtypstamms WTF im Überstand von 293- und HeLa-Zellen als VLPs detektiert werden (Abb. 4.8). Wie in den Experimenten zur DRM-Assoziation migrierte sowohl zellassoziertes als auch sezerniertes M-Protein als Doppelbande. Die quantitative Analyse des aus 293-Zellen freigesetzten M(ED) ergab, dass bis zu 2 % des gesamten in den Zellen exprimierten Proteins aus den transfizierten Zellen in den Überstand sezerniert werden (Abb. 4.9 und 4.11). Dies war für beide M-Proteine unterschiedlichen Ursprungs etwa gleich und entspricht dem Anteil des M-Proteins, der aus infizierten Zellen freigesetzt wurde (Abb. 4.8, obere Reihe), wie die in Abbildung 4.11 für 293-Zellen dargestellte Quantifizierung zeigt. In allen Fällen bestätigte sich eine insgesamt ineffiziente Partikel-Freisetzung für MV.

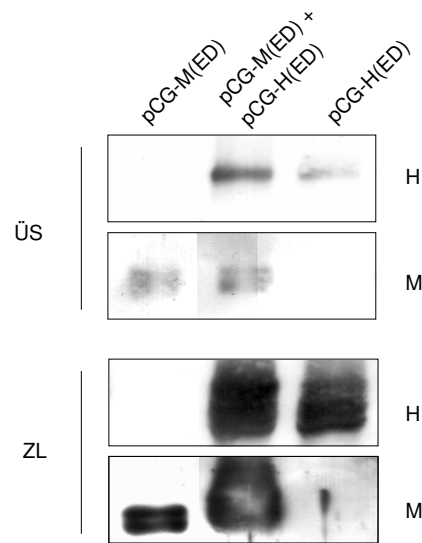
Nachdem gezeigt worden war, dass M-Proteine die Fähigkeit zur Abschnürung von VLPs haben, wurde der Einfluss der Glykoproteine H und F auf die M-Protein-getriebene VLP-Produktion untersucht.

293-Zellen wurden mit den Plasmiden pCG-M(ED) oder pCG-H(ED) ko-transfiziert und 48 h später geerntet und fraktioniert. Nach dem Auftrennen der Proteine im SDS-Gel erfolgte der Nachweis der MV-Proteine M und H im Western Blot (Abb. 4.9). Wie in dem in Abb. 4.8 dargestellten Experiment konnte ein kleiner Anteil des M-Proteins im Überstand M-exprimierender Zellen nachgewiesen werden. Interessanterweise wurde auch ein Teil des H-Proteins

in den Überstand von H-Protein-exprimierenden Zellen freigesetzt. Die Koexpression des H-Proteins zusammen mit dem M-Protein führte zur Freisetzung M- und H-Protein-haltiger VLPs, wobei die Menge der im Überstand detektierbaren Proteine gegenüber der bei Einzelexpression beider Proteine unverändert blieb.



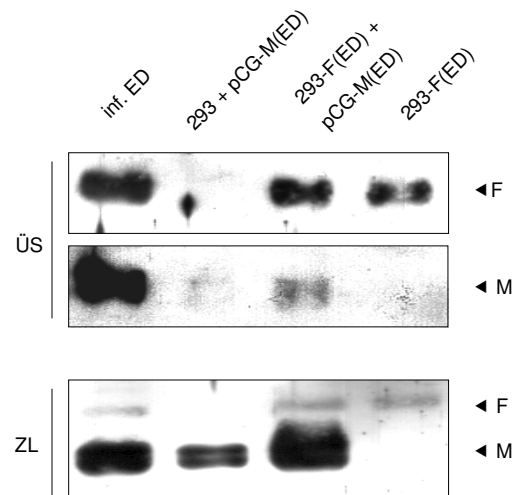
**Abbildung 4.8: Freisetzung von VLPs durch die MV-Proteine M(ED) und M(WTF).** 293-Zellen oder HeLa-Zellen wurden mit pCG-M(ED) oder pCG-M(WTF) transfiziert oder 293-Zellen wurden entweder mit MV(ED) infiziert (MOI 0,5) (inf. ED) oder oder unbehandelt (NK) gelassen. Die Überstände dieser Zellen (ÜS) wurden nach 48 h ultrazentrifugiert und das sedimentierte Material zusammen mit 1/60 der aus den Zellen hergestellten Zelllysaten (ZL) gelelektrophoretisch in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Die Zellen wurden mit NP-40-Lysepuffer lysiert. Im Western Blot wurden die M-Proteine mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper (MAB8910) nachgewiesen.



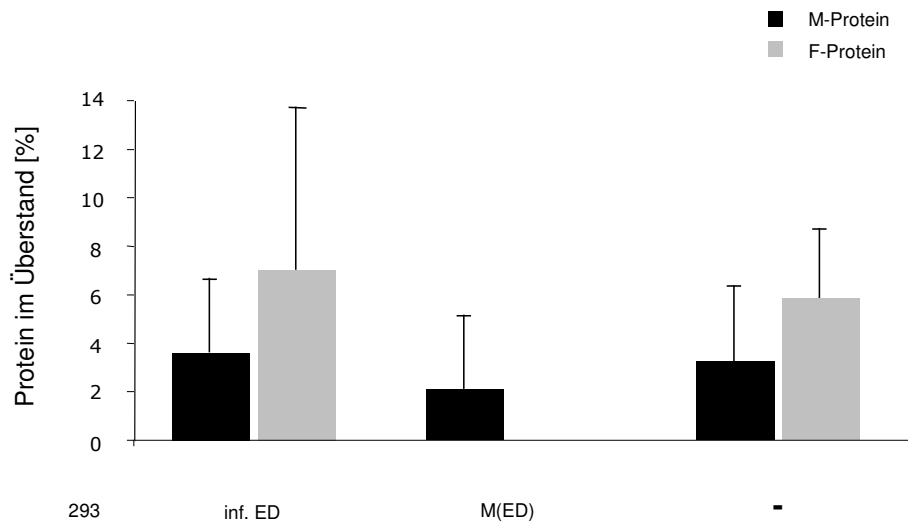
**Abbildung 4.9: Freisetzung von VLPs durch MV M- und H-Proteine.** 293-Zellen wurden entweder mit pCG-M(ED), pCG-H(ED) oder einer Kombination aus beiden Plasmiden transfiziert. Die Überstände dieser Zellen (ÜS) wurden nach 48 h ultrazentrifugiert und das sedimentierte Material zusammen mit 1/60 der aus den Zellen hergestellten Zelllysaten (ZL) gelelektrophoretisch in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Für den Western Blot wurden der  $\alpha$ -MV-M-Antikörper (MAB8910) und das MV-H-spezifische Kaninchenserum H45 verwendet.

In dem folgenden Experiment wurde untersucht, ob das F-Protein die M-getriebene VLP-Produktion beeinflusst. 293- oder 293-F(ED)-Zellen wurden nicht oder pCG-M(ED) transfiziert und wie oben beschrieben analysiert. Auch die Überstände von 293-F(ED)-Zellen, die kein M(ED) exprimierten, wurden gesammelt. Als Positivkontrolle dienten ED-infizierte 293-Zellen (MOI 0,5; 48 h nach Infektion). Die Überstände wurden 48 h nach der Transfektion wie oben beschrieben aufbereitet, die Zellen lysiert und die Proteine M und F nachgewiesen (Abb. 4.10). Dabei zeigte sich, dass die Anwesenheit von F in stabil F(ED) exprimierenden Zellen (293-F(ED)) die Freisetzung von M-Protein aus den Zellen nicht verstärkt (Abb. 4.11). Offensichtlich gibt es keine Korrelation zwischen der M-getriebenen VLP-Produktion und der Menge an M-Protein, die mit DRMs assoziiert ist. Erstaunlicherweise konnte beobachtet werden, dass auch das F-Protein unabhängig vom M-Protein effizient in den Überstand freigesetzt wurde (jeweils durchschnittlich 6 % des F-Proteins) (Abb. 4.10, obere Reihe, und Abb. 4.11). Somit scheinen M- und F-Protein nicht

kooperativ, sondern unabhängig voneinander die Freisetzung von VLPs anzutreiben. Wiederum entsprach die Menge des F-Proteins im Überstand der transfizierten Zellen derjenigen, die aus den Überständen infizierter Zellen sedimentiert wurde (Abb. 4.11).



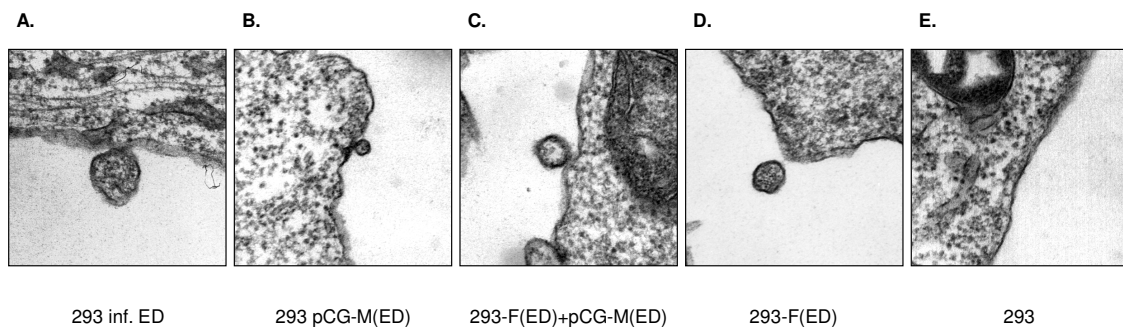
**Abbildung 4.10: Freisetzung von VLPs durch MV M- und F-Proteine.** 293-Zellen wurden entweder mit MV(ED) infiziert (MOI 0,5) (inf. ED) oder mit pCG-M(ED) transfiziert, 293-F(ED)-Zellen wurden ebenfalls mit pCG-M(ED) transfiziert oder unbehandelt gelassen. Die Überstände dieser Zellen (ÜS) wurden nach 48 h ultrazentrifugiert und das sedimentierte Material zusammen mit 1/60 der aus den Zellen hergestellten Zellysate (ZL) gelelektrophoretisch in einem 15%igen SDS-Gel aufgetrennt. Für den Western Blot wurden der  $\alpha$ -MV-M-Antikörper (MAB8910) und das MV-F-spezifische Kaninchenserum F42 verwendet.



**Abbildung 4.11: Quantifizierung der in den Überstand freigesetzten M- und F-Proteinmengen aus transfizierten und infizierten Zellen.** Für die in den Abb. 4.8 und 4.9 beschriebenen Experimente (vgl. Abschnitt 4.2.5) mit infizierten und M-Protein-exprimierenden transfizierten 293- und 293-F(ED)-Zellen sowie unbehandelten 293-F(ED)-Zellen wurden die in den Überstand freigesetzten Mengen an M- und F-Protein als prozentualer Anteil der Gesamtproteinmenge im Überstand und Zelllysat bestimmt. Dazu wurden die Western Blots digitalisiert und mit Hilfe des Computerprogramms AIDA (Raytest) ausgewertet. Die freigesetzte Proteinmenge im Überstand und im Zelllysat wurde zurückgerechnet und als 100 % gesetzt. Dargestellt ist die Anzahl der Experimente (für M: n=4, für F: n=3).

Um festzustellen, dass es sich bei dem aus den Überständen sedimentierten Material tatsächlich um VLPs, also membranumhüllte Vesikel, handelte, wurden nicht-infizierte oder transfizierte 293- und 293-F(ED)-Zellen, MV(ED)-infizierte 293-Zellen, oder pCG-M(ED)-transfizierte 293- und 293-F(ED)-Zellen, mit Glutardialdehyd fixiert, in Epon eingebettet und transmissionselektronenmikroskopisch analysiert. Die Infektion erfolgte für 24 h mit einer MOI von 0,05, während die transfizierten Zellen nach 48 h fixiert und analysiert wurden.

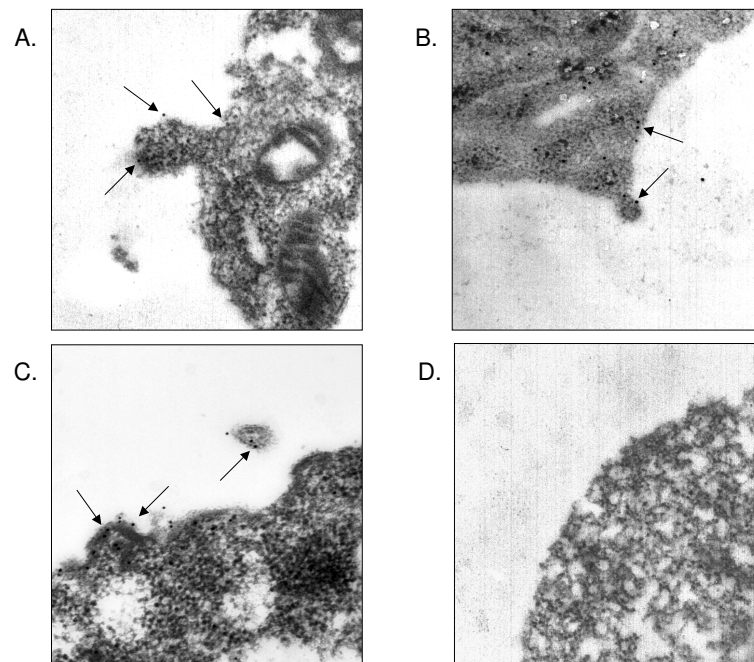
An der Zelloberfläche transfizierter und infizierter F- und/oder M-exprimierender Zellen konnten deutlich knospende vesikuläre Strukturen detektiert werden (Abb. 4.12 (A-D)), die in untransfizierten Zellen nicht nachweisbar waren (Abb. 4.12 (E)). Dabei waren die knospenden VLPs durchschnittlich um 30 % kleiner als die viralen Partikel (Abb. 4.12 (A-D)).



**Abbildung 4.12: Transmissionselektronenmikroskopische Analyse der Partikelfreisetzung aus infizierten und transfizierten 293 und 293-F(ED)-Zellen.** 293-Zellen wurden mit einer MOI von 0,05 infiziert (A.) oder 293- bzw. 293-F(ED)-Zellen wurden mit pCG-M(ED) transfiziert (B. und C.) oder unbehandelt gelassen (D. und E.). 48 h nach Infektion oder Transfektion wurden die Zellen fixiert, entwässert und in Epon eingebettet. Die angefertigten Ultradünnschnitte wurden mit dem Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Abgebildet ist jeweils ein Ausschnitt der Oberfläche einer Zelle. Alle Aufnahmen wurden bei 25 000-facher Vergrößerung aufgenommen.

Um zu zeigen, dass die aus transfizierten und infizierten Zellen knospenden Partikel M-Protein enthielten, wurden 293- und 293-F(ED)-Zellen mit pCG-M(ED) transfiziert und 293-Zellen mit MV(ED) mit einer MOI von 0,05 für 48 h infiziert. Sie dienten als Positivkontrolle und unbehandelte 293-Zellen als Negativkontrolle. Mit Hilfe der Methode der Immunlokalisation wurde unter Verwendung des M-spezifischen Antikörpers MAB8910 und einem an 12-nm-kolloidale Goldpartikel gekoppelten Sekundärantikörpers das M-Protein nachgewiesen. In Abbildung 4.13(A-D) ist zu sehen, dass die knospenden Strukturen tatsächlich M-Protein enthalten.





**Abbildung 4.13: Nachweis von M-Protein mittels Immunlokalisation mittels Transmissionselektronenmikroskopie.** 293-Zellen wurden mit einer MOI von 0,05 infiziert (A.) oder 293- bzw. 293-F(ED)-Zellen, wurden mit pCG-M(ED) transfiziert (B. und C.) oder unbehandelt gelassen (D. und E.). 48 h nach Infektion oder Transfektion wurden die Zellen fixiert, entwässert und in LR-White eingebettet. Die Zellen in den angefertigten Ultradünnschnitten wurden mit dem  $\alpha$ -M-Antikörper MAB8910 gefärbt und mit einem an kolloidale Goldpartikel-gebundenen Sekundärantikörper im Transmissionselektronenmikroskop analysiert. Abgebildet ist jeweils ein Ausschnitt der Oberfläche einer Zelle. Alle Aufnahmen wurden bei 25 000-facher Vergrößerung aufgenommen. Einige der Goldpartikel sind mit Pfeilen hervorgehoben.

Diese Ergebnisse zeigen, dass das M-Protein und auch das F-Protein unabhängig voneinander als treibende Kraft für die Morphogenese membranumhüllter Vesikel (VLPs) fungieren können. Die knospenden Strukturen konnten mit dem Transmissionselektronenmikroskop dokumentiert werden, waren kleiner als virale Partikel und enthielten in den M-transfizierten 293- und 293-F(ED)-Zellen sowie den infizierten 293-Zellen M-Protein, das mittels Immunlokalisation nachgewiesen wurde.

### 4.3 Differentielle subzelluläre Verteilung von MV-Proteinen

Die Infizierbarkeit unterschiedlicher Zellen und Zelllinien mit MV hängt einerseits von dem Vorhandensein der Eintrittsrezeptoren CD46 bzw. CD150 ab, zum anderen sind auch intrazelluläre Faktoren und Mechanismen bedeutend für die Produktion von neuen Viruspartikeln. Die produktive Infektion

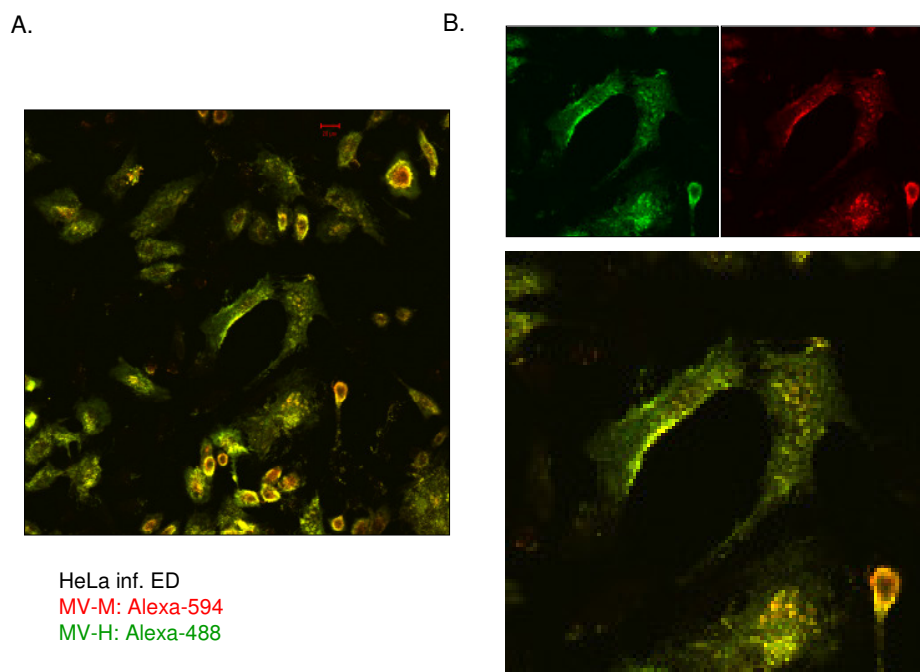
mit MV unterliegt in bestimmten Zelltypen Restriktionen, die dazu führen, dass die Zellen das Virus rezeptorvermittelt aufnehmen, aber beispielsweise keine neuen infektiösen Partikel entstehen oder diese defekt sind. Zu solchen Zellen gehören DCs, in denen nach der Infektion virale Proteine exprimiert werden, jedoch keine infektiösen Partikel zellassoziiert oder im Überstand detektierbar sind (Schneider-Schaulies et al., 2003b). Ziel der nachfolgend beschriebenen Experimente war, zu untersuchen, inwiefern Unterschiede in der subzellulären Verteilung viraler Proteine in produktiv infizierbaren HeLa-Zellen und nicht produktiv infizierbaren DCs bestehen, die einen mögliche Erklärungsansatz für die beobachteten Unterschiede in der Freisetzung infektiöser Partikel geben.

#### 4.3.1 Subzelluläre Verteilung des MV M- und H-Proteins

Um die Verteilung des M- und des H-Proteins in den unterschiedlichen Zelltypen zu untersuchen, wurden HeLa-Zellen, unreife DCs mit MV ED oder unreife und reife DCs mit MV WTF infiziert. Die Infektion erfolgte für 24 h mit einer MOI von 0,5. Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Bei den in den folgenden Abbildungen gezeigten Fluoreszenzaufnahmen ist das M-Protein jeweils in Rot dargestellt und das H-Protein in Grün. Bereiche, in denen sich beide Signale überlagern, erscheinen gelb und bedeuten eine Kollokalisierung der Proteine. Als Kontrollen dienten Mock-behandelte Zellen. Zusätzlich zu den abgebildeten Aufnahmen, die unter Verwendung beider Laser dargestellt wurden, wurden Aufnahmen mit Anregung durch jeweils nur einen der Laser gemacht. Damit konnte sichergestellt werden, dass es zu keiner Interferenz und somit nicht zu falsch positiven Ergebnissen kam.

Die HeLa-Zellen wurden in 24-Napf-Zellkulturschalen auf Deckgläschen ausgesät, am folgenden Tag mit MV ED infiziert und gefärbt. Die Immunfluoreszenzaufnahmen in Abbildung 4.14 zeigen die intrazelluläre Verteilung beider Proteine. Abbildung 4.14 (A) ist eine Übersicht, in der beide Fluoreszenzen überlagert dargestellt sind und Abbildung 4.14 (B) ein vergrößerter Ausschnitt aus (A), der zwei ED-infizierte M- und H-Protein-exprimierende Zellen zeigt. In der oberen Reihe von (B) sind die

Einzelfluoreszenzaufnahmen für die grüne und rote Fluoreszenz dargestellt, im unteren Bild die Überlagerung beider. Das M- und das H-Protein wiesen eine weitgehende Kollokalisierung auf. Dabei lagen beide Proteine zum Teil in Assoziation mit der Zytoplasmamembran vor, aber auch im Zytoplasma. Die zytoplasmatische Verteilung der beiden Proteine war nicht homogen, sondern punktiert konzentriert. Dies deutet auf eine Assoziation mit Zellorganellen oder auf nicht membranassoziierte Protein-Aggregationen hin.



**Abbildungen 4.14-17: Verteilung der MV-Proteine M und H in unterschiedlichen Zelltypen.** Kulturen der Zellen wurden mit MV ED oder WTF (MOI 0,5) für 24 h infiziert und anschließend fixiert und permeabilisiert. Das MV-H-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -H-Primärantikörper K4 und einem Alexa488-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (grün). Nachfolgend wurde das MV-M-Protein mit dem biotinylierten  $\alpha$ -MV-M-Antikörper und Alexa594-gekoppeltem Streptavidin gefärbt (rot). Die Gelbfärbung zeigt eine Überlagerung des roten und grünen Signals an, wenn beide Proteine in räumlicher Nähe zueinander vorliegen. (A): Übersicht über mehrere Zellen (Vergrößerung: 400-fach), (B): Vergrößerter Ausschnitt aus (A), bei dem die grün-fluoreszierenden H-positiven und rot-fluoreszierenden M-positiven Zellen einzeln dargestellt sind, sowie das sich aus der Überlagerung beider Aufnahmen ergebende Bild.

**Abbildung 4.14: Verteilung der MV-Proteine M und H in ED-infizierten HeLa-Zellen.**

Unreife DCs wurden entweder mit MV ED oder MV WTF wie oben beschrieben infiziert, fixiert, permeabilisiert und gefärbt.

In Abbildung 4.15 sind Aufnahmen unreifer ED-infizierter DCs dargestellt. In einer Übersicht sind mehrere H- und M-exprimierende infizierte Zellen zu sehen (Abb. 4.15 (A)). Abbildung 4.15 (B) zeigt einen Ausschnitt aus (A). Oben links ist nur die Verteilung des H-Proteins, oben rechts nur die des M-Proteins dargestellt, im unteren Teil von (B) das sich aus der Überlagerung beider ergebende Bild. Die beiden Proteine wiesen eine weitgehende Kolo-kalisation auf. Wie auch im Falle der HeLa-Zellen kolokalisierten beide Proteine weitestgehend. Zu beobachten waren zwei unterschiedliche Arten der intrazellulären Verteilung von M und H. In etwa der Hälfte aller untersuchten Zellen ließen die Proteine keine großflächige Assoziation mit der Zytoplasmamembran erkennen. Dagegen akkumulierte der größere Anteil der beiden MV-Proteine intrazellulär. In dem anderen Teil der Zellen säumten die Proteine die Zytoplasmamembran (Abb. 4.15 (A)). Diese Verteilung war vergleichbar mit der in den HeLa-Zellen beobachteten (vergleiche Abb. 4.14).

Doppelimmunfluoreszenzaufnahmen unreifer WTF-infizierter DCs sind in Abbildung 4.16 zu sehen. Die Übersichtsaufnahme in Abbildung 4.16 (A) zeigt mehrere infizierte Zellen, in denen die Proteine H und M wie auch in den zuvor untersuchten ED-infizierten HeLa-Zellen und unreifen DCs kolokolisieren. Wie auch bei einem Teil der ED-infizierten DCs akkumulierten die Proteine intrazellulär in einzelnen größeren Bereichen. Die Einzelzellanalyse in Abbildung 4.16 (B) zeigt eine fast vollständige Kolo-kalisation beider Proteine.

Die Ergebnisse der Studie zur subzellulären Verteilung des M- und H-Proteins in den reifen WTF-infizierten DCs zeigt Abbildung 4.17. Wie auch für die zuvor beschriebenen Experimente zeigt Abbildung 4.17 (A) eine Übersichtsaufnahme, bei der beide Fluoreszenzen gleichzeitig aufgenommen wurden, und (B) einen daraus vergrößerten Ausschnitt. Im oberen Teil von (B) ist links nur die Verteilung des H-Proteins und rechts die des M-Proteins zu sehen. Es wird deutlich, dass die Proteine in gleicher Weise wie bei den unreifen WTF-infizierten und einem Teil der unreifen ED-infizierten DCs verteilt waren. Die

Proteine wiesen eine fast vollständige Kolo-kalisation auf, hauptsächlich in intrazellulären Aggregaten.

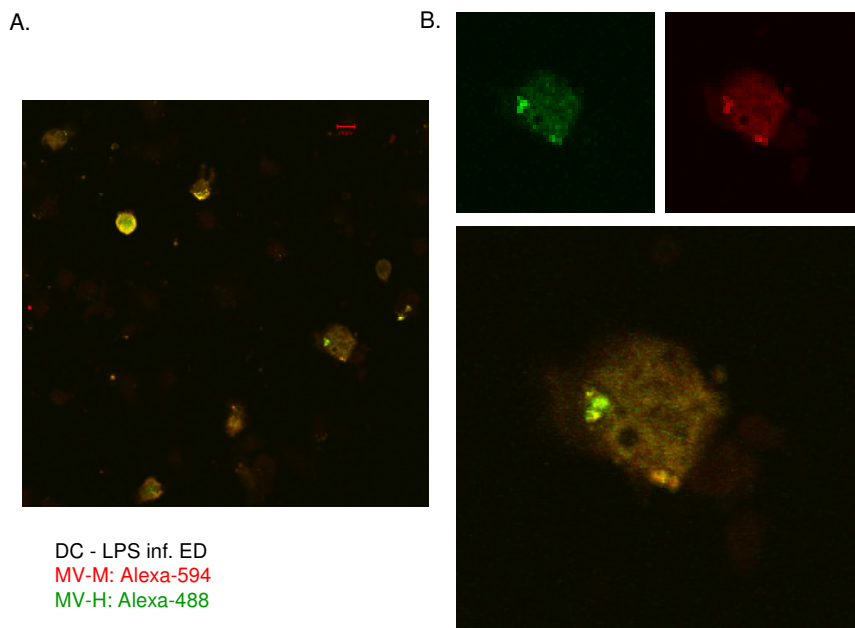


Abbildung 4.15: Verteilung der MV-Proteine M und H in ED-infizierten unreifen DCs.

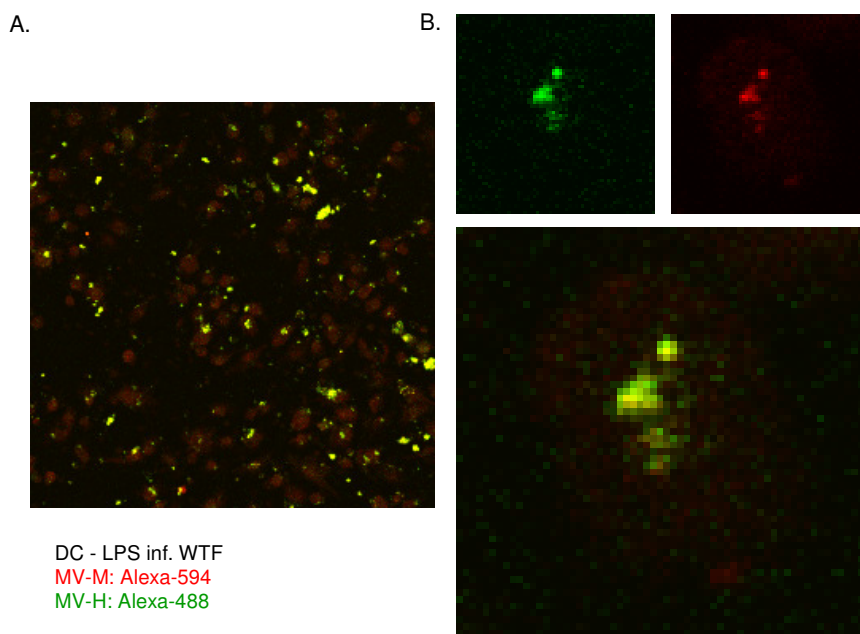
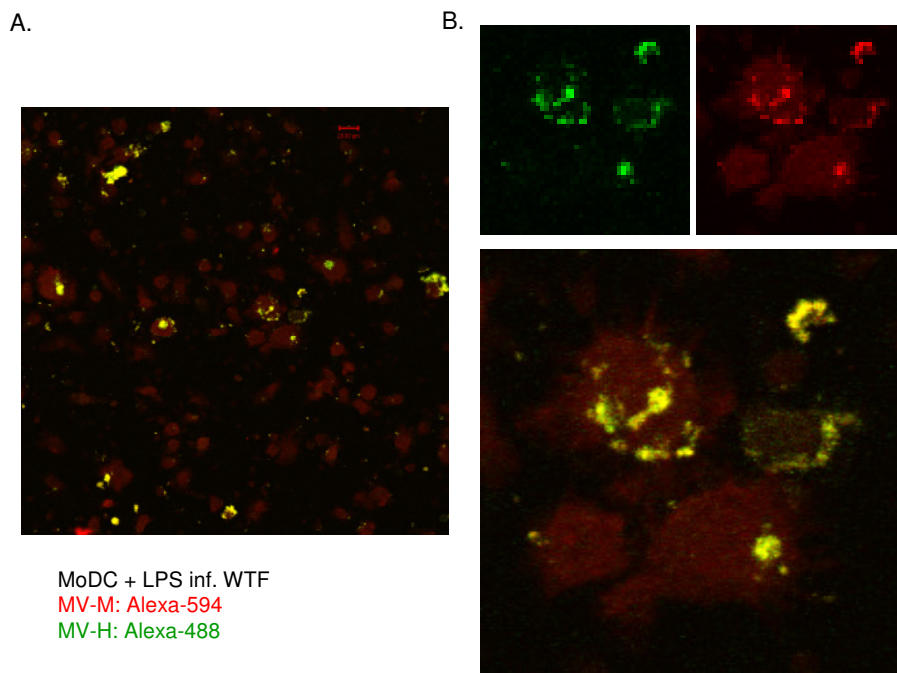


Abbildung 4.16: Verteilung der MV-Proteine M und H in WTF-infizierten unreifen DCs.



**Abbildung 4.17: Verteilung der MV-Proteine M und H in WTF-infizierten reifen DCs.**

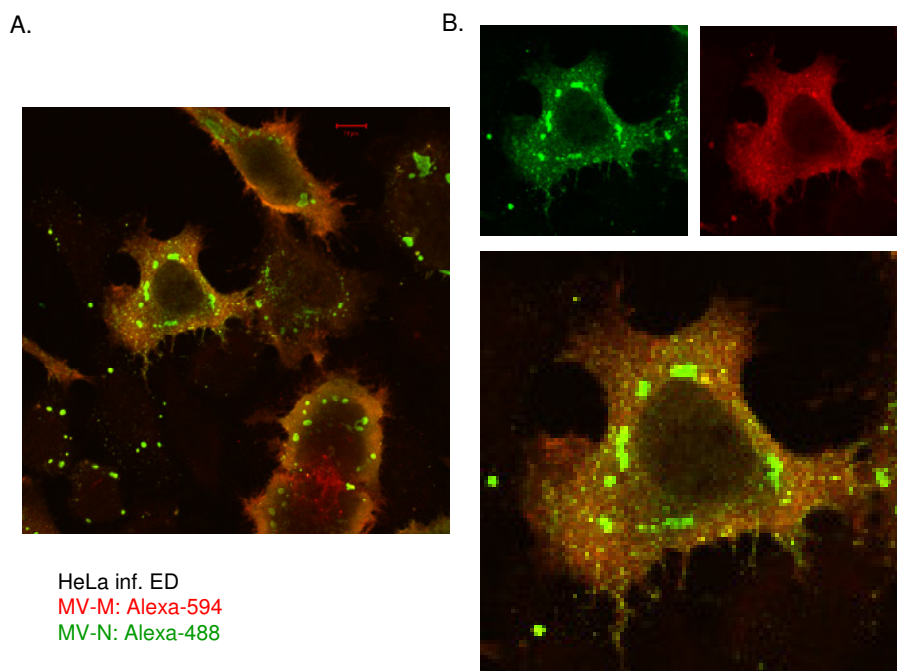
Die hier beschriebenen Untersuchungen zur intrazellulären Verteilung der MV-Proteine M und H in der humanen Fibroblastenzelllinie HeLa und unreifen und reifen DCs zeigen, dass in DCs die MV-Proteine vorwiegend intrazellulär akkumulieren und nicht an der Zytoplasmamembran, dem Ort der Virusfreisetzung. So kann eine abweichende Verteilung der viralen Proteine, also eine veränderte Proteinsortierung und damit ein abweichender Proteintransport als mögliche Erklärung für die beobachtete fehlende Freisetzung infektiöser Partikel aus DCs dienen.

#### **4.3.2 Subzelluläre Verteilung des MV M- und N-Proteins**

In den im Folgenden dargestellten Experimenten wurde die subzelluläre Verteilung der MV-Proteine M und N in ED-infizierten HeLa-Zellen und unreifen DCs vergleichend untersucht. Des Weiteren wurden unreife und reife WTF-infizierte DCs in diese Untersuchungen einbezogen.

Alle Zellen wurden mit einer MOI von 0,5 für 24 h infiziert und anschließend fixiert, permeabilisiert und gefärbt. Auf den folgenden Fluoreszenzaufnahmen ist das M-Protein rot und das N-Protein grün dargestellt. Gelbe Flächen zeigen eine Kolo-kalisation der beiden Proteine an. Wie für den Nachweis der H- und M-Proteine wurden die entsprechenden Kontrollfärbungen an Mock-behandelten Zellen durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.3.1). In den Abbildungen ist jeweils in (A) eine Übersicht über mehrere Zellen gezeigt, in (B) ein vergrößerter Ausschnitt aus (A), in dem oben links die grüne Fluoreszenz das N-Protein und oben rechts die rote Fluoreszenz das M-Protein darstellt. Der untere Teil von (B) zeigt die Überlagerung beider Signale.

Die in 24-Napf-Zellkulturschalen auf Deckgläschen ausgesäten HeLa-Zellen wurden am folgenden Tag mit MV ED infiziert und gefärbt. Abbildung 4.18 zeigt Aufnahmen der Doppelfärbungen des N- und M-Proteins. Das M-Protein wies wie in der Doppelfärbung mit dem H-Protein (vgl. Abb. 4.14) eine Assoziation mit der Zytoplasmamembran auf und war in intrazellulären kleineren und größeren Anhäufungen zu finden. Das N-Protein zeigte eine ähnliche Verteilung. Darüber hinaus sind die typischen großen Akkumulationen der N-Proteine zu sehen, die ebenfalls kleinere Mengen des M-Proteins enthalten. Die Kolo-kalisation der Proteine war partiell und ausgeprägt in den perinukleären Aggregaten, die große Mengen des N-Proteins enthielten. An der Zytoplasmamembran war vorwiegend das M-Protein nachweisbar.



**Abbildung 4.18-21: Verteilung der MV-Proteine M und N in unterschiedlichen Zelltypen.** Kulturen der Zellen wurden mit MV ED oder WTF (MOI 0,5) für 24 h infiziert und anschließend fixiert und permeabilisiert. Das MV-N-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -N-Primärantikörper F227 und einem Alexa488-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen (grün). Nachfolgend wurde das MV-M-Protein mit dem biotinylierten  $\alpha$ -MV-M-Antikörper und Alexa594-gekoppeltem Streptavidin gefärbt (rot). (A): Übersicht über mehrere Zellen (Vergrößerung: 400-fach), (B): Vergrößerter Ausschnitt aus (A), bei dem eine grün-fluoreszierende und rot-fluoreszierende Zelle einzeln dargestellt sind, sowie das sich aus der Überlagerung beider Aufnahmen ergebende Bild.

**Abbildung 4.18: Verteilung der MV-Proteine M und N in ED-infizierten HeLa-Zellen.**

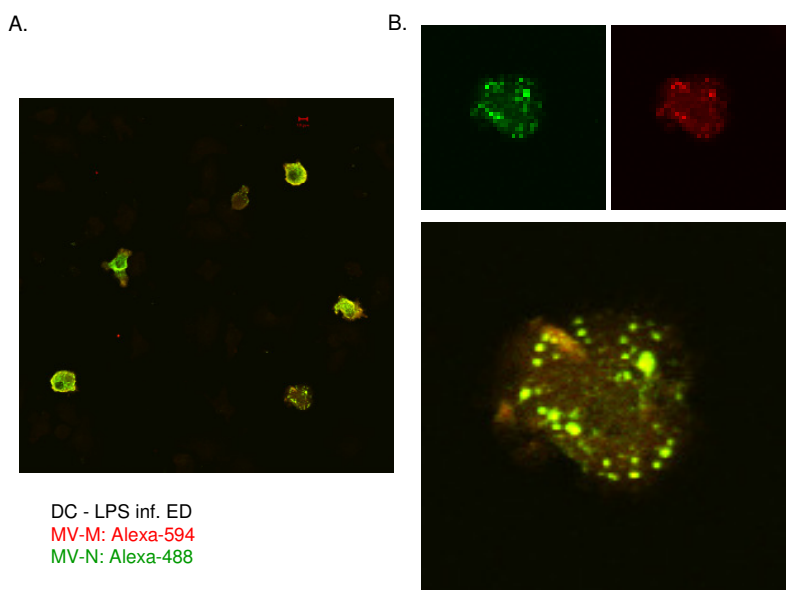
In Abbildung 4.19 ist die Verteilung von N- und M-Protein in unreifen ED-infizierten DCs dargestellt. Abbildung 4.20 repräsentiert die Ergebnisse für unreife WTF-infizierte DCs und Abbildung 4.21 die für reife WTF-infizierte DCs. In den unreifen DCs verteilen sich N- und M-Protein fast identisch. Beide Proteine sind einigen Zellen in kleineren perinukleären Akkumulationen nachweisbar. Wie zuvor bei der Untersuchung der Lokalisation der ED-H- und ED-M-Proteine zu beobachten war, assoziierten die Proteine bei anderen Zellen mit der Plasmamembran.

In den unreifen mit WTF infizierten DCs waren beide Proteine in kleineren und größeren zytoplasmatischen Anhäufungen zu finden (Abb. 4.20). Diese waren

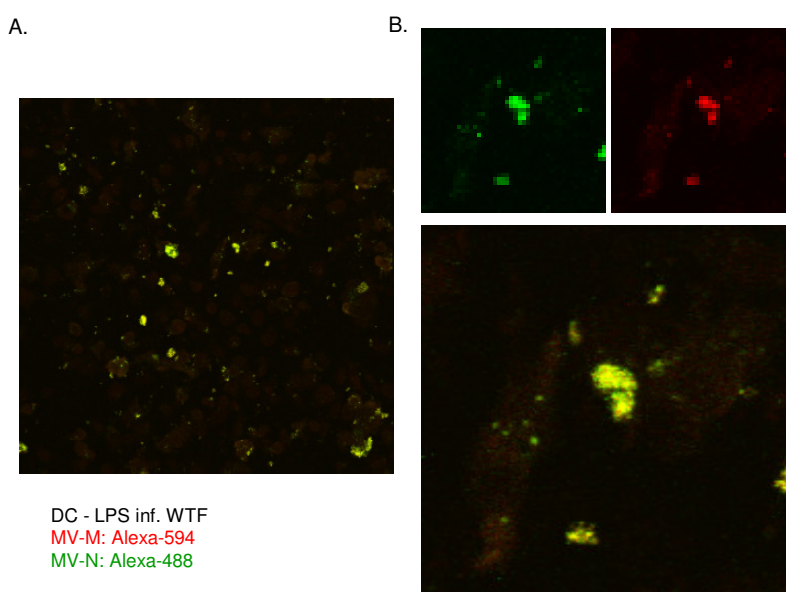


zum Teil von geringer Anzahl (1-5) und häufig an einem Zellpol in direkter Nähe zur Zytoplasmamembran lokalisiert.

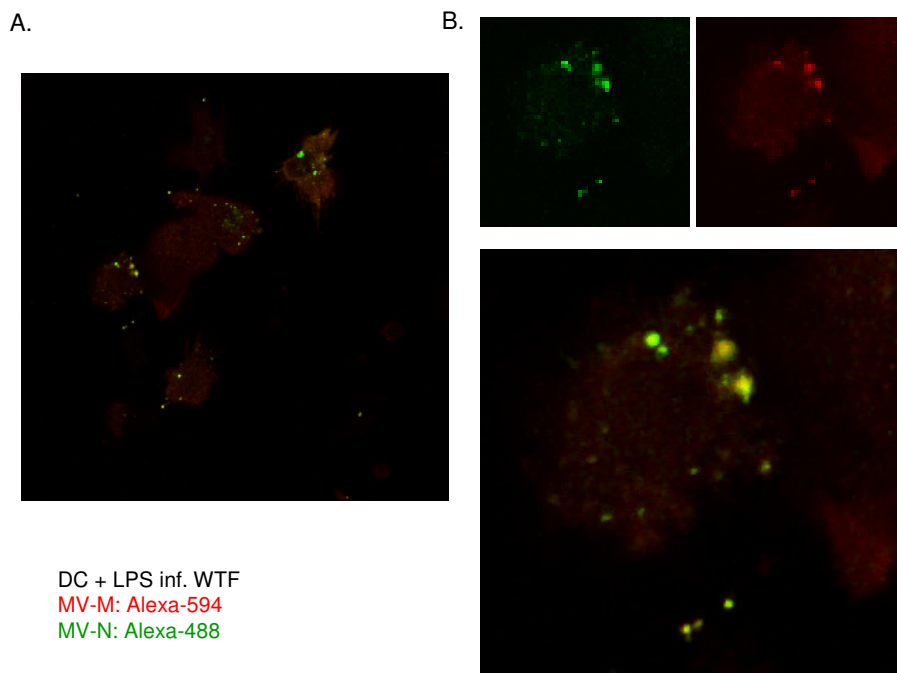
Auch in reifen WTF-infizierten DCs lässt sich eine nahezu vollständige Überlagerung der beiden Signale (Gelb) erkennen, die auf eine Kolo-kalisation der M- und N-Proteine hindeutet (Abb. 4.21) und sie ähnelt stark der in unreifen WTF-infizierten DCs (Abb. 4 20).



**Abbildung 4.19:** Verteilung der MV-Proteine M und N in ED-infizierten unreifen DCs.



**Abbildung 4.20:** Verteilung der MV-Proteine M und N in WTF-infizierten unreifen DCs.



**Abbildung 4.21: Verteilung der MV-Proteine M und N in WTF-infizierten reifen DCs.**

Interessanterweise kolokalisierte das N-Protein in DCs nahezu vollständig mit dem M-Protein, das in diesen Zellen wie in Abschnitt 4.3.1 gezeigt wurde auch mit dem H-Protein kolokalisierte. Diese Beobachtung deutet daraufhin, dass wahrscheinlich alle viralen Komponenten einen gemeinsamen Bestimmungsort in der Zelle erreichen und sich dort anhäufen.

Wird die Verteilung der MV-Proteine M und N in permissiven HeLa-Zellen mit der in DCs verglichen, so wird ein massiver Unterschied in der Proteinverteilung offensichtlich. Besonders ausgeprägt war dies in WTF-infizierten DCs unabhängig von ihrem Reifungsgrad, während in unreifen ED-infizierten DCs zumindest ein Teil der Zellen eine Proteinlokalisierung aufwies, die der in HeLa-Zellen ähnelt. Es erscheint, dass der Transport der Proteine innerhalb der Zelle in den beiden untersuchten Zelltypen voneinander abweicht. In den DCs, die praktisch keine infektiösen Partikel freisetzen, erreichte der größte Anteil der Proteine nicht den Knospungsort, die Plasmamembran.

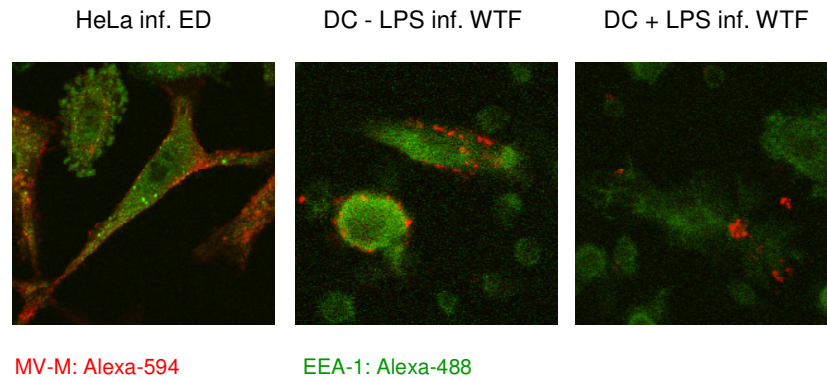
## 4.4 Identifikation MV-Protein-enthaltender Zellkompartimente

In dem folgenden Abschnitt wurde untersucht, ob und mit welchen zellulären Membrankompartimenten MV-Proteine, insbesondere das M-Protein assoziiert. Aus früheren Untersuchungen ist bekannt, dass M-Proteine anderer Viren wie das HIV-1 Gag-Protein oder das M-Protein des Marburgvirus VP40 mit späten endosomalen Kompartimenten interagieren (Kolesnikova et al., 2002, Martin-Serrano et al., 2001). Von besonderem Interesse war hierbei auch, ob und inwieweit diese Kompartimente in HeLa-Zellen und DCs identisch sind.

### 4.4.1 MV-Proteine sind nicht mit frühen Endosomen assoziiert

Um zu untersuchen, ob das MV M-Protein mit dem frühen endosomalen Kompartiment assoziiert ist, wurden in ED-infizierten HeLa-Zellen und unreifen und reifen WTF-infizierten DCs die Verteilung von EEA-1, einem Marker für frühe Endosomen, und des M-Proteins untersucht. Die Infektion der Zellen erfolgte in allen Fällen für 24 h und mit einer MOI von 0,5. Nach dem Fixieren und Permeabilisieren der Zellen wurden die Zellen gefärbt. In Abbildung 4.22 ist das EEA-1-Protein in Grün dargestellt ist und das virale M-Protein in Rot.

In den ED-infizierten HeLa-Zellen (Abb. 4.22, links), den WTF-infizierten unreifen DCs (Abb. 4.22, Mitte) und den reifen WTF-infizierten DCs (Abb. 4.22, rechts) zeigten die EEA-1-positiven frühen Endosomen eine perinukleäre Verteilung. Das M-Protein wies die zuvor in Abschnitt 4.3.1 beschriebene Verteilung auf. In den HeLa-Zellen lag es in Assoziation mit der Zytoplasmamembran und zytoplasmatisch in punktförmigen Ansammlungen vor. In den DCs war es in größeren Akkumulationen perinukleär detektierbar. In keinem der Fälle konnte ein gelbes Überlappungssignal, das eine Kolo-kalisation beider Proteine anzeigt, beobachtet werden. Es erscheint daher, dass MV-Proteine in HeLa-Zellen und DCs während der Infektion mit MV nicht mit frühen Endosomen assoziiert sind.



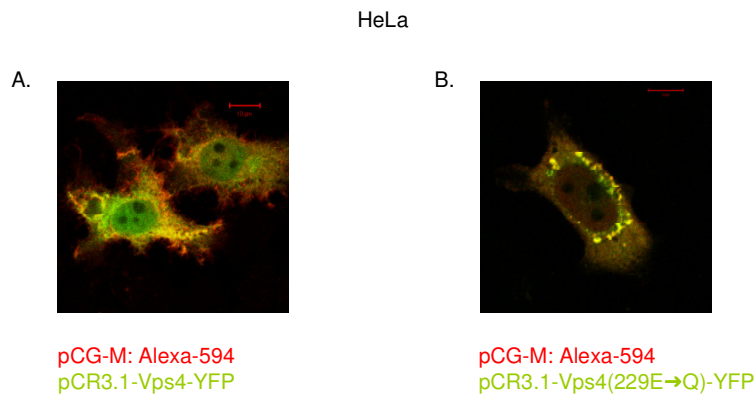
**Abbildung 4.22: Subzelluläre Verteilung der MV-M-Proteine und des frühen Endosomenmarkers EEA-1.** HeLa-Zellen wurden mit MV ED (MOI 0,5) und unreife DC oder reife DC, die vor der Infektion für 24 h mit 100 ng/ml LPS ausgereift worden waren, wurden mit MV WTF (MOI 0,5) infiziert. 24 h nach der Infektion wurden die Zellen fixiert und permabilisiert. Der Nachweis von MV-M erfolgte mit dem  $\alpha$ -MV-M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper (rot). EEA-1 wurde mit einem Kaninchenserum gegen EEA-1 sowie einem Alexa-488-gekoppelten  $\alpha$ -Kaninchen-Sekundärantikörper gefärbt. Alle Aufnahmen wurden bei 630-facher Vergrößerung aufgenommen.

#### 4.4.2 Assoziation des MV M-Proteins mit MVBs in HeLa-Zellen

MVBs, die zu den endosomalen Kompartimenten gehören, spielen eine wichtige Rolle im zellulären Transport. Charakteristisch ist die große Anzahl interner Vesikel. Sie liefern Proteine von der Zelloberfläche zum Abbau in Lysosomen. Auch ein retrograder endosomaler Transportweg ist bekannt. Er spielt bekanntermaßen in der Sortierung von viralen M-Proteinen eine Rolle (Martin-Serrano et al., 2003). Assoziiert mit den MVBs sind sogenannte Klasse-E-Faktoren. Sie sind für die Sortierung der Proteine verantwortlich, die in der Regel L-Domänen aufweisen und mono-ubiquitiniert sind, und ermöglichen die Knospung von Vesikeln in das Lumen der MVBs, ein Ereignis, das topologisch äquivalent zum Knospen von Viruspartikeln an der Zelloberfläche ist. Eines der zu den Klasse-E-Faktoren gehörenden Proteine ist die AAA-Typ-ATPase Vps4, die spät im Knospungsprozess die Ablösung anderer Proteine begünstigt. Eine katalytisch inaktive, dominant-negative Mutante führt zur Bildung abnormer Endosomen, die keine internalen Vesikel aufweisen (Babst et al., 1997, Babst et al., 1998).

Um zu untersuchen, ob auch das MV M-Protein mit MVBs kolokalisiert, wurden HeLa-Zellen mit den Plasmiden pCG-M(ED) und pCR3.1-YFP-Vps4 oder pCR3.1-YFP-Vps4(229E→Q) kotransfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Das MV M-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -MV-M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper (rot) nachgewiesen, während das an Vps4- bzw. Vps4(229E→Q)-gekoppelte YFP bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm gelbgrün fluoreszierte.

Das M-Protein wies die bereits beschriebene intrazelluläre Verteilung und eine partielle Assoziation mit der Zytoplasmamembran auf (vergleiche Abb. 4.1(A), 4.14, 4.18) und kolokalisierte mit dem YFP-gekoppelten Vps4 (Abb. 4.23 (A)). Auch die dominant-negative Form des Vps4, YFP-Vps4(229E→Q), wies eine weitgehende Kolokalisation mit dem M-Protein auf. Die Koexpression des M-Proteins mit dieser Form des Vps4 führte allerdings zu einer drastischen Umverteilung des M-Proteins in den Zellen, welche sich deutlich von der des funktionellen Vps4 (Abb. 4.23 (B)) unterschied. Beide Proteine akkumulierten in großen intrazellulären Kompartimenten, den abnormen MVBs. Diese Ergebnisse zeigen nicht nur eine räumliche Nähe dieser Proteine zueinander an und belegen eine Assoziation des M-Proteins mit MVBs, sondern deuten auch auf eine physische Interaktion beider Proteine miteinander hin. Dies gibt einen ersten Hinweis auf eine Involvierung der Klasse-E-Faktoren an dem Knospungsprozess von MV und der M-Protein getriebenen VLP-Freisetzung aus infizierten bzw. transfizierten Zellen.



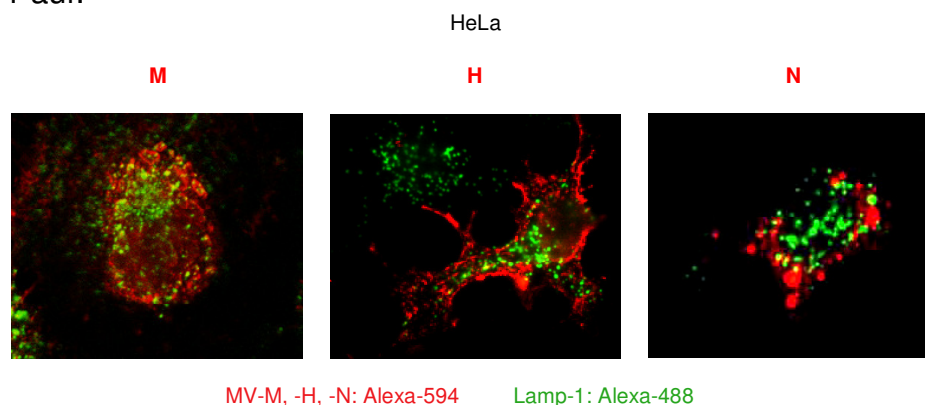
**Abbildung 4.23: Subzelluläre Verteilung des MV M-Proteins, YFP-Vps4 und seiner dominant-negativen Form YFP-Vps4(229E→Q) in doppelt transfizierten HeLa-Zellen.** Deckglaskulturen von HeLa-Zellen wurden mit den Plasmiden pCG-M(ED) und pCR3.1-YFP-Vps4 oder pCR3.1-YFP-Vps4(229E→Q) doppelt transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. Das MV M-Protein wurde mit dem  $\alpha$ -MV-M-Primärantikörper MAB8910 und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper (rot) nachgewiesen, während das an Vps4- bzw. Vps4(229E→Q)-gekoppelte YFP bei Anregung mit Licht der Wellenlänge 488 nm gelbgrün fluoreszierte. (A) zeigt zwei M- und YFP-Vps4-exprimierende Zellen und (B) eine M- und YFP-Vps4(229E→Q)-exprimierende Zelle.

#### 4.4.3 Zelltypabhängige Assoziation von MV-Proteinen mit Lamp-1-positiven späten Endosomen

Im Verlauf des retrograden endosomalen Transportes können Proteine von den endosomalen Membranen zur Zelloberfläche transportiert werden. Zu den am Transport beteiligten endosomalen Kompartimenten gehören neben den MVBs auch Lamp-1-positive späte Endosomen. Diese kommen sowohl in Fibroblasten als auch in spezialisierten Zellen wie DCs vor. Insbesondere in DCs sind die Proteinsortierungsmechanismen besonders ausgeprägt und die endosomalen Kompartimente sehr divers und im Verlauf der Ausreifung veränderlich. Für VP40, das M-Protein des Marburgvirus, wurde gezeigt, dass es mit Lamp-1-positiven Membranen interagiert und über den retrograden Weg an die Zelloberfläche gelangt (Kolesnikova et al., 2004a, Kolesnikova et al., 2002). In den hier beschriebenen Versuchen wurde untersucht, ob auch das M-, N- oder H-Protein des MV in unterschiedlichen Zelltypen (HeLa-Zellen, unreife und reife DCs) mit diesen späten Endosomen assoziiert sind.

Für alle im Folgenden dargestellten Versuche wurden die Zellen für 24 h mit MV ED oder WTF infiziert, anschließend fixiert und permeabilisiert und mit Antikörpern gegen Lamp-1 einerseits und gegen die MV-Proteine M, H und N andererseits gefärbt (Abb. 4.24 bis 4.27). Das Lamp-1 ist jeweils in Grün und die viralen Proteine sind in Rot dargestellt.

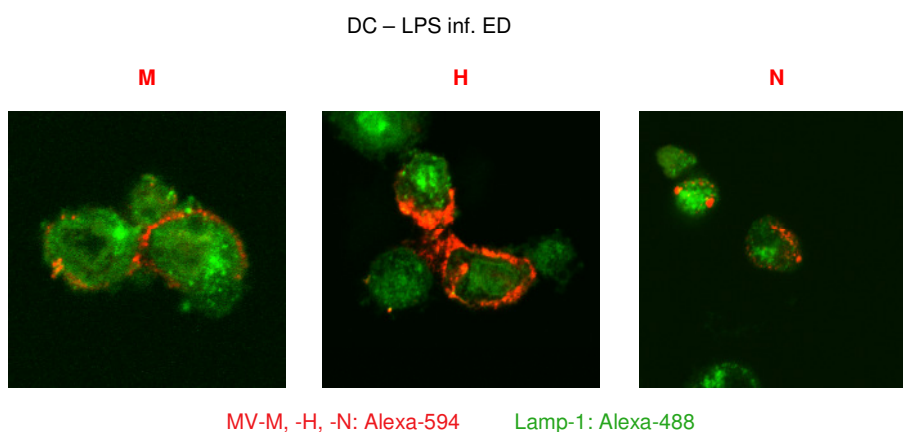
Abbildung 4.24 zeigt die Verteilung der Proteine M (links), H (Mitte) und N (rechts) in Doppelfärbungen mit Lamp-1 in ED-infizierten HeLa-Zellen. Das M-Protein weist eine perinukleäre Verteilung im Zytoplasma auf und eine partielle Assoziation mit der Plasmamembran. Ein Teil der M-Proteine kolokalisierte deutlich mit Lamp-1-positiven Endosomen. Insbesondere das in der Nähe der Plasmamembran vorliegende M-Protein wies keine Überlagerung mit Lamp-1 auf und nicht alle Lamp-1-positiven Bereiche weisen auch eine M-Färbung auf. Die Kolokalisation ist nur partiell und deutet darauf hin, dass die Assoziation mit spät endosomalen Kompartimenten transient ist. Das H-Protein lag hauptsächlich plasmamembranständig vor und wies keine Kolokalisation mit Lamp-1 auf. Auch das N-Protein, das in den charakteristischen großen perinukleären Aggregaten gefunden wurde, wies nur eine sehr schwache Kolokalisation mit Lamp-1 auf.



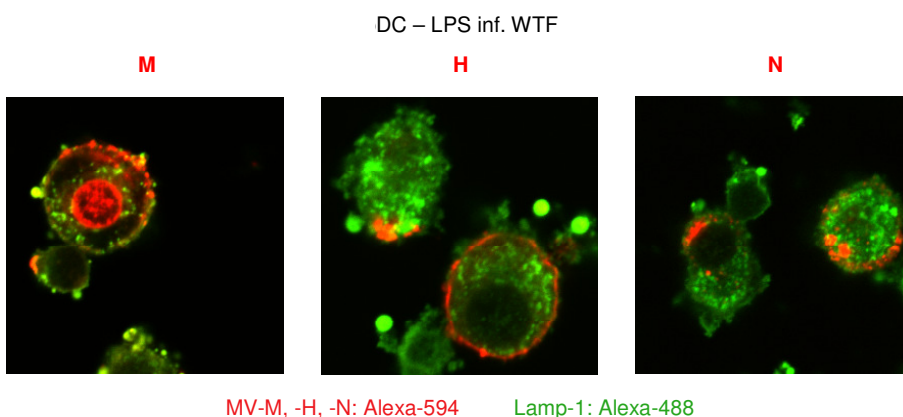
**Abbildung 4.24-27: Subzelluläre Verteilung der MV-Proteine M, H und N sowie des Markers für späte Endosomen Lamp-1 in unterschiedlichen Zelltypen.** Kulturen der Zellen wurden mit MV ED oder WTF mit einer MOI von 0,5 für 24 h infiziert und anschließend fixiert und permeabilisiert. Anschließend wurden die verschiedenen MV-Proteine zusammen mit Lamp-1 in einer Doppelfärbung nachgewiesen. Lamp-1 wurde mit einem Lamp-1-spezifischen Kaninchenserum und einem Alexa488-markierten  $\alpha$ -Kaninchen-Sekundärantikörper gefärbt. Die MV-Proteine wurden mit den monoklonalen Antikörpern  $\alpha$ -MV-M MAB8910 (links),  $\alpha$ -MV-H K4 (Mitte) bzw.  $\alpha$ -MV-N F227 (rechts) und einem Alexa594-gekoppelten  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper nachgewiesen.

**Abbildung 4.24: Subzelluläre Verteilung der MV-Proteine M, H und N sowie des Markers für späte Endosomen Lamp-1 in ED-infizierten HeLa-Zellen.**

In Abbildung 4.25 sind doppelt Lamp-1- und M-, H- bzw. N-gefärbte unreife DCs, die mit MV-ED infiziert wurden, zu sehen. Die viralen Proteine M (links), H (Mitte) und N (rechts) lagen punktartig verteilt nahe der Zytoplasmamembran vor und kolokalisierten nicht mit den perinukleär vorkommenden Lamp-1-positiven späten Endosomen. Vergleichbare Beobachtungen ließen sich auch in unreifen WTF-infizierten DCs machen, wie Abbildung 4.26 zeigt.



**Abbildung 4.25: Subzelluläre Verteilung der MV-Proteine M, H und N sowie des Markers für späte Endosomen Lamp-1 in unreifen ED-infizierten DC.**

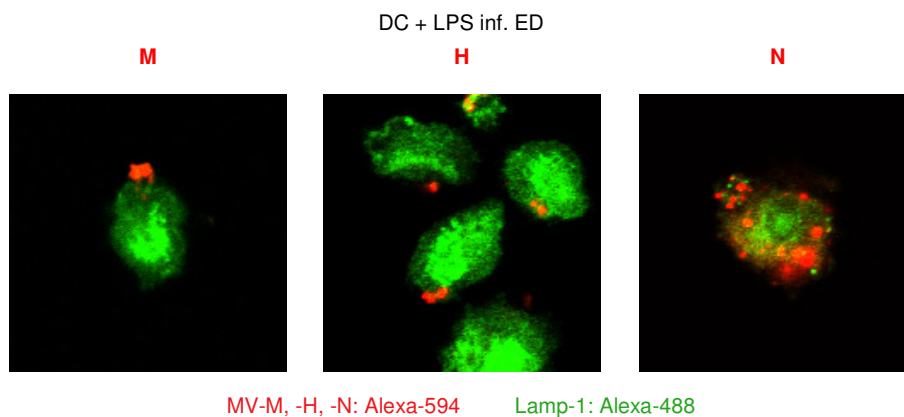


**Abbildung 4.26: Subzelluläre Verteilung der MV-Proteine M, H und N sowie des Markers für späte Endosomen Lamp-1 in unreifen WTF-infizierten DC.**

In reifen ED-infizierten DCs unterschied sich die subzelluläre Verteilung der viralen Proteine von der in unreifen infizierten DCs. Sowohl das M-Protein (links) als auch das H-Protein (Mitte) und das N-Protein (rechts) befanden sich



in wenigen größeren Akkumulationen in den infizierten Zellen (Abb. 4.27). Auch in diesen Zellen war keines der viralen Proteine mit späten Lamp-1-positiven Endosomen assoziiert. In keiner der Aufnahmen sind gelbe Überlagerungssignale sichtbar.



**Abbildung 4.27: Subzelluläre Verteilung der MV-Proteine M, H und N sowie des Markers für späte Endosomen Lamp-1 in reifen ED-infizierten DC.**

Nur in HeLa-Zellen kolokalisierte ein Teil des M-Proteins mit den Lamp-1-haltigen späten Endosomen. In den reifen und unreifen DCs konnte keine Assoziation der viralen Proteine mit diesem Kompartiment beobachtet werden. Ebenso wenig waren virusspezifische Unterschiede detektierbar. Die hier dargestellten Ergebnisse unterstützen die Annahme, dass das M-Protein während seines Transportes in produktiv infizierbaren HeLa-Zellen mit späten Endosomen interagiert. Dieser Transportweg ist abweichend von den anderen untersuchten viralen Proteinen H und N, die nicht mit Lamp-1 kolokalisierten.

#### **4.4.4 CD81-positive Kompartimente enthalten MV-Proteine in DCs**

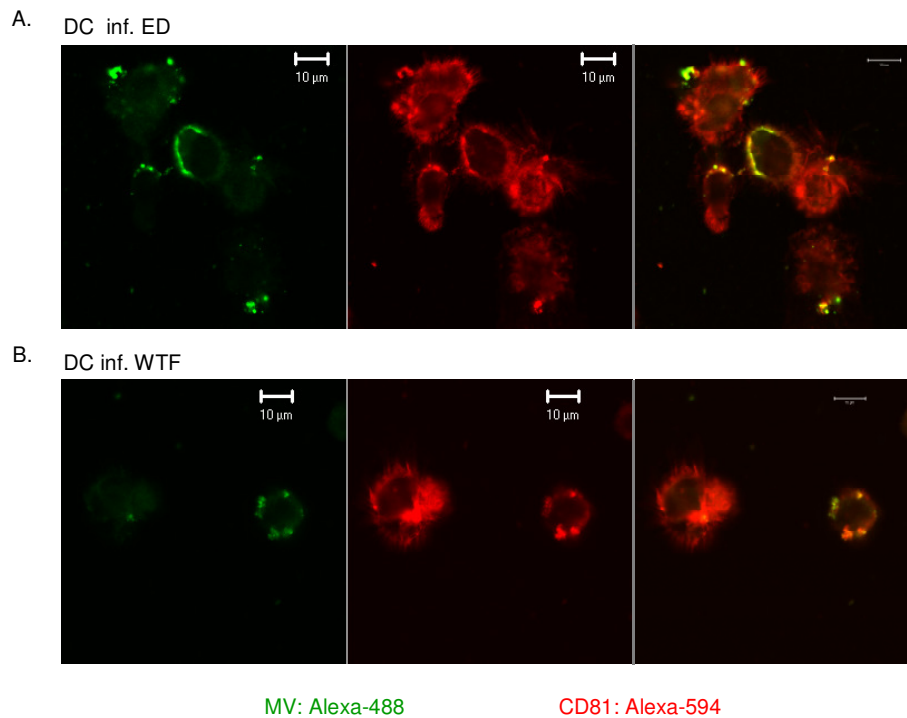
In professionell Antigen-präsentierenden Zellen (APCs) wie DCs und Makrophagen sind die endosomalen Kompartimente besonders ausgeprägt und spezialisiert. Bei CD81 handelt es sich um ein sogenanntes Tetraspanin, das als Marker für eine Untergruppe von MVBs/späten Endosomen in APCs dient, jedoch teilweise auch auf der Zelloberfläche exprimiert wird. Dieses endosomale Kompartiment, das reich an verschiedenen anderen Tetraspaninen

wie CD82 oder CD9 ist, ist an der MHC-Klasse-II-abhängigen Antigenpräsentation beteiligt. Es wird daher auch als MIIC bezeichnet (Murk et al., 2002) und unterscheidet sich von stark Lamp-1-haltigen späten Endosomen. In primären Makrophagen knospen entstehende HIV-Partikel in dieses endosomale Kompartiment, das auch als Virosom bezeichnet wird (Pelchen-Matthews et al., 2003). Ziel der hier dargestellten Versuche war, zu untersuchen, ob MV-Proteine in unreifen und reifen DCs mit diesem Kompartiment interagieren.

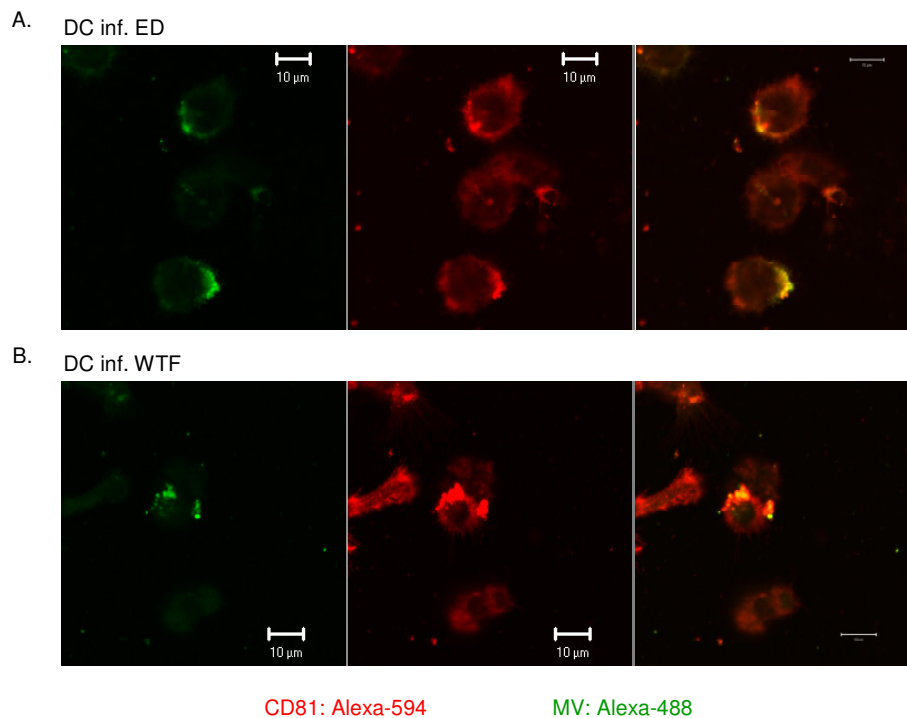
Unreife und reife DCs wurden jeweils mit ED oder WTF infiziert. Die Infektion erfolgte für 24 h mit einer MOI von 0,5. Anschließend erfolgte die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen. Gefärbt wurde in den Zellen das zelluläre Tetraspanin CD81. Der Nachweis der Virusproteine wurde mit einem  $\alpha$ -MV-Humanserum durchgeführt. CD81 erscheint in den Abbildungen 4.28 und 4.29 rot und die MV-Proteine grün (im Unterschied zu den Abb. 4.14-4.27). Links und in der Mitte jeder Teilabbildung sind die Einzelfluoreszenzen, rechts ihre Überlagerung zu sehen.

In Abbildung 4.28 sind unreife DCs zu sehen, die entweder mit ED (Abb. 4.28 (A)) oder mit WTF infiziert wurden (Abb. 4.28 (B)). In den infizierten Zellen waren die MV-Proteine (in grün) in perinukleären Akkumulationen nachweisbar oder säumten die Plasmamembran. CD81 (in rot) fand sich überwiegend plasmamembranständig, aber auch im Zytoplasma. Die MV-positiven Kompartimente enthielten fast ausnahmslos auch CD81. Auch in vor der Infektion mit LPS ausgereiften DCs war das Ergebnis sehr ähnlich. Wie zuvor beobachtet (vgl. Abb. 4.27), waren die intrazellulären MV-Protein-haltigen Kompartimente größer und weniger in der Anzahl, die Assoziation mit der Plasmamembran war nicht ausgeprägt (Abb. 4.29). Es waren keine Unterschiede hinsichtlich der Proteinverteilung zwischen ED (Abb. 4.29 (A)) und WTF infizierten Zellen (Abb. 4.29 (B)) erkennbar.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass MV-Proteine in DCs unabhängig von ihrem Reifungsgrad und dem Virustyp mit CD81-positiven endosomalen Kompartimenten assoziiert sind.



**Abbildung 4.28: Subzelluläre Verteilung von MV-Proteinen und zellulärem CD81, einem Marker für Tetraspanin-haltige endosomale Kompartimente in unreifen MV ED- und WTF-infizierten DCs.** Die Zellen wurden für 24 h entweder mit MV ED (A) oder WTF (B) infiziert (MOI 0,5). Nachfolgend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. In einer Doppelfärbung erfolgte der Nachweis von MV-Proteinen durch Verwendung eines humanen  $\alpha$ -MV-Serums und eines Alexa488-gekoppelten  $\alpha$ -Human-Sekundärantikörpers (grün). Zur Färbung von CD81 diente ein monoklonaler  $\alpha$ -CD81-Antikörper und ein  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper, der Alexa594 gekoppelt war (rot). (A) und (B) sind Aufnahmen, in denen entweder nur die grüne (MV-Proteine, links) oder die rote Fluoreszenz (CD81, Mitte) sichtbar ist. Jeweils rechts sind beide Fluoreszenzen (rot und grün) überlagert dargestellt.



**Abbildung 4.29: Subzelluläre Verteilung von MV-Proteinen und zellulärem CD81, einem Marker für Tetraspanin-haltige endosomale Kompartimente in reifen MV ED- und WTF-infizierten DCs.** Die Zellen wurden vor der Infektion für 24 h mit LPS (100 ng/ml) ausgereift und danach entweder mit MV ED (A) oder WTF (B) infiziert (MOI 0,5). Anschließend wurden die Zellen fixiert und permeabilisiert. In einer Doppelfärbung erfolgte der Nachweis von MV-Proteinen durch Verwendung eines humanen  $\alpha$ -MV-Serums und eines Alexa488-gekoppelten  $\alpha$ -Human-Sekundärantikörpers (grün). Zur Färbung von CD81 diente ein monoklonaler  $\alpha$ -CD81-Antikörper und ein  $\alpha$ -Maus-Sekundärantikörper, der Alexa594 gekoppelt war (rot). (A) und (B) sind Aufnahmen, in denen entweder nur die grüne (MV-Proteine, links) oder die rote Fluoreszenz (CD81, Mitte) sichtbar ist. Jeweils rechts sind beide Fluoreszenzen (rot und grün) überlagert dargestellt.

## 5 Diskussion

In Analogie zu Befunden in orthologen Viren wurde auch für das MV M-Protein eine wesentliche Bedeutung für den Zusammenbau und die Freisetzung viraler Partikel postuliert (Rima et al., 1995a). Diese Hypothese wurde unterstützt durch den Befund, dass MV M-Gene bei persistierenden Infektionen, die *in vivo* und *in vitro* durch fehlerhaftes Knospen charakterisiert sind, häufig Mutationen aufweisen.

Diese sind begleitet von einer verminderten Expressionsrate, einem Funktionsverlust, der Instabilität oder dem völligen Fehlen des Proteins (Rima & Duprex, 2005, Schneider-Schaulies et al., 2003a, Schneider-Schaulies et al., 1995b).

Auch wenn diese Mutationen und ihre Folgen als verantwortlich für die fehlende Virusproduktion im zentralen Nervensystem gelten, so wurde die Bedeutung des MV M-Proteins für die Partikelproduktion und -morphogenese bisher nicht im Detail untersucht.

Ein monoklonaler Antikörper (B347), der gegen das M-Protein des Vakzinestamms ED gerichtet ist und im Institut für Virologie und Immunbiologie hergestellt wurde, unterschied sich von dem kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörper (MAB8910) in seiner Fähigkeit, das M-Protein von Wildtypstämmen in persistierend oder lytisch infizierten Zellen zu erkennen (Abb. 4.3). Dieser Antikörper erkennt ein nicht-lineares Epitop und seine abweichende Reaktivität legt nahe, dass sich die M-Proteine von Wildtypstämmen strukturell von denen des Vakzinestamms ED unterscheiden.

Es ist seit langem bekannt, dass M-Proteine sich hinsichtlich ihrer elektrophoretischen Mobilität unterscheiden (Rima et al., 1995a, Rima et al., 1979). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Aminosäure an Position 89 des M-Proteins in erster Linie hierfür verantwortlich ist. Der Austausch der in Vakzinestämmen vorkommenden Aminosäure Lysin durch Glutaminsäure, wie sie in Wildtypstämmen an dieser Position zu finden ist, führte zu einer deutlichen Veränderung des Migrationsverhaltens, das aber dem

des jeweils authentischen Proteins nicht vollständig entsprach (Abb. 4.1(B)). Auch andere Aminosäuren (z. B. an den Positionen 64 und 209) tragen offensichtlich in geringem Umfang zum unterschiedlichen Migrationsverhalten bei. Eine Analyse der Aminosäuresequenzen des M-Proteins von Wildtyp- und Vakzinestamm ergab keinen Hinweis auf potenzielle Stellen für posttranslationale Modifikationen wie Phosphorylierung oder Acylierung, unterschiedliche Eigenschaften hervorrufen könnten.

Sind die Unterschiede auch bekannt, so ist unverständlich, welche biologischen Eigenschaften des M-Proteins sie beeinflussen. Die Substitution der Aminosäure an Position 89 von Glutaminsäure durch Lysin und auch die Substitution der Aminosäure an Position 64 von Prolin durch Serin führt in einem rekombinanten MV zu einer Verbesserung der Fähigkeit zur Replikation in der Zelllinie Vero (Miyajima et al., 2004, Tahara et al., 2005). Der Austausch eines Prolins, das als einzige Aminosäure eine sekundäre Aminogruppe enthält, beeinflusst in der Regel die Proteinstruktur. Eine darüber hinausgehende funktionelle Untersuchung ist bislang nicht zugänglich. So bleibt die funktionelle Bedeutung dieser einzelnen Substitutionen weiterhin unklar.

Allerdings wird der strukturelle Unterschied nicht durch die Aminosäure an Position 89 bedingt, da sich der einzelne Austausch dieser Aminosäure nicht auf die antigenen Eigenschaften auswirkt (Abb. 4.2). Für die unterschiedliche Antigenität könnte die Aminosäure an Position 64 verantwortlich sein, was in weiterführenden Experimenten mit rekombinanten M-Proteinen, in denen jeweils nur diese Aminosäure ausgetauscht wird, untersucht werden könnte.

Offensichtlich beeinträchtigt die Aminosäure an Position 89 auch die biologischen Eigenschaften der M-Proteine nicht. So besitzen die M-Proteine des Vakzinestamms ED (M(ED)) und des Wildtypstamms WTF (M(WTF)) sowie die beiden M-Proteine, die die Punktmutationen tragen, M(ED89K→E) und M(WTF89E→K), die Fähigkeit zur Oligomerisierung (Abb. 4.4). Dies ist wahrscheinlich von entscheidender Bedeutung für die Partikelmorphogenese, wie für das orthologe Ebolavirusprotein VP40 gezeigt werden konnte (Gomis-Ruth et al., 2003, Hoenen et al., 2005, Panchal et al., 2003). Die Arbeit von Gomis-Ruth und Mitarbeitern zeigt, dass die Interaktion mit RNA die Effizienz

der Oligomerisierung beeinflusst. In der vorliegenden Arbeit wurde dieser Aspekt nicht untersucht, obwohl die bestehenden Methoden dies ermöglichen würden und er in weiteren Experimenten genauer studiert werden könnte. Ein Einfluss der Aminosäure an Position 89 auf die Fähigkeit zur Bildung von VLPs wurde ebenfalls nicht untersucht. Aufgrund der in dieser Arbeit erhobenen Daten ist nicht zu erwarten, dass diese Substitution einen Effekt darauf hat, da in den durchgeführten Experimenten keine Unterschiede in den biologischen Eigenschaften der M-Proteine des Wildtypstamms WTF und des Vakzinstamms ED zu beobachten waren. So waren die intrazelluläre Verteilung sowie die Oligomerisationsfähigkeit und VLP-Freisetzung gleichartig (Abb. 4.1(A), 4.4, 4.8).

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass ein Austausch von Valin zu Alanin an Position 101 innerhalb des MV M-Proteins die Stabilität des Proteins, dessen Bindung an Membranen und seine Akkumulation an der Zytoplasmamembran stark beeinträchtigt, während seine Fähigkeit zur Interaktion mit dem N-Protein unverändert ist. In Zellen, die mit dem rekombinanten Virus, das diese Mutation trägt, infiziert wurden, unterbleibt der Kotransport von N- und M-Proteinen zur Plasmamembran und es wird kaum Virus produziert. Somit scheint die intrazelluläre Akkumulation des M-Proteins für den RNP-Transport wichtig zu sein (Runkler et al., 2006). Diese Studie belegte, dass eine Dimerisierung der M-Proteine weiterhin erfolgt. Ob eine weitere Oligomerisierung zu größeren Einheiten noch möglich ist, bleibt unklar. Die M-Proteine von Ebolavirus und VSV liegen in unterschiedlichen Konformationen vor (Gaudin et al., 1997, Gomis-Ruth et al., 2003, Hoenen et al., 2005). Auf diese Weise kann das Protein in der infizierten Zelle mehrere unterschiedliche Funktionen wahrnehmen und es wäre denkbar, dass Ähnliches auch für das MV M-Protein zutrifft.

Obwohl das MV M-Protein nach transienter Expression in der Epithelzelllinie MDCK nicht in Assoziation mit der Zytoplasmamembran vorlag (Riedl et al., 2002), so zeigt die vorliegende Arbeit, dass alle analysierten M-Proteine 24 h

nach der Transfektion an der Zelloberfläche detektierbar waren (Abb. 4.1(A)). Angesichts des Befundes, dass M-Proteine alle zur Knospung benötigten Signale enthalten, wie durch ihre Fähigkeit zur Produktion von VLPs für M(ED) und M(WTF) belegt wurde (Abb. 4.8-10), ist dies nicht überraschend. Die fehlende Membranassoziation in MDCK-Zellen könnte somit auf zelltypspezifische Unterschiede im Proteintransport zurückzuführen sein und es wäre daher interessant zu untersuchen, ob MDCK-Zellen M-Protein-haltige VLPs freisetzen können.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass M-Proteine in SDS-Polyacrylamidgelen unabhängig von ihrer Herkunft und der Art der Aminosäure an Position 89 als Doppelbanden migrierten (Abb. 4.1(B), 4.8-10). Dies war reproduzierbar und durch Veränderung der Laufbedingungen wie Acrylamidkonzentration oder Auftrennungsdistanz konnten diese Doppelbanden in Einzelbanden konvertiert werden. Die Detektion von Doppelbanden setzte eine höhere Acrylamidkonzentration (15 %) und eine weite Auftrennungsdistanz voraus sowie einen langsamen Gellauf (über Nacht) bei reduzierter Spannung. Wurden dagegen geringere Konzentrationen Acrylamid verwendet, die Spannung erhöht bzw. die Laufdistanz verringert, so erschienen die M-Proteine als Einzelbanden. Dies ist beispielsweise für die Darstellung der Ubiquitin-Modifikation dokumentiert (Abb. 4.5). Die beobachteten Doppelbanden sind vermutlich auf eine posttranslationale Modifikation des Proteins zurückzuführen, auch wenn bisher unklar ist, um welche es sich dabei handelt. Eine für Membran-assoziierte Proteine oft beschriebene charakteristische Lipidmodifikation erscheint als wahrscheinlichste Erklärung, konnte jedoch bislang nur für das palmitoylierte F-Protein des MV nachgewiesen werden (Caballero et al., 1998).

Auch wenn es nicht ausgeschlossen werden kann, sind Modifikationen wie Phosphorylierung oder Ubiquitinierung als Erklärung für das Auftreten der Doppelbanden eher unwahrscheinlich. Ersteres wurde nur für die MV N- und P-Proteine nachgewiesen und bei Letzterem steht die Einfachheit der Detektion der beiden Proteinspezies im Gegensatz zu der Schwierigkeit die Ubiquitin-



Modifikation zu belegen. Sie konnte nur bei einem kleinen Anteil des Proteins detektiert werden, was der sehr transienten Natur dieser Modifikation entspricht (Demirov & Freed, 2004, Hartlieb & Weissenhorn, 2006, Martin-Serrano et al., 2005, Strack et al., 2000). Die Ubiquitin-Modifikation von Proteinen steht in Übereinstimmung mit der Notwendigkeit dieser Klasse-E-Faktor-abhängigen Modifikation zur Initiation und schrittweisen Rekrutierung von ESCRT-Komplexen und der nachfolgenden Sortierung und Vesikelknospung in MVBs, die bei Viren dem Transport von M-Proteinen zur Plasmamembran, dem Ort der Partikelknospung, entspricht. Ob der MV M-Protein-Transport und die Knospung einen retrograden endosomalen Transport benötigt wie für das Marburgvirus VP40-Protein gezeigt, bleibt zu untersuchen (Kolesnikova et al., 2004a, Kolesnikova et al., 2004b, Kolesnikova et al., 2002). Es gibt jedoch experimentelle Hinweise dafür, dass dies der Fall sein könnte. So kolokalisierte in transfizierten Zellen das MV- M-Protein mit der AAA-Typ-ATPase Vps4, die in diesem Prozess eine zentrale Rolle spielt. Außerdem resultierte die Koexpression von M mit einer dominant-negativen Form von Vps4 in einer drastischen Umverteilung beider Proteine (Abb. 4.23). Inwiefern der Transport zur Zytoplasmamembran und die Morphogenese von VLPs oder viraler Partikel von Vps4 abhängen, bleibt ebenso wie die Beteiligung anderer Komponenten (z. B. Tsg101, AIP-1/ALIX) dieser Sortierungsmaschinerie Gegenstand weiterer Untersuchungen.

Funktionelle klassische L-Domänen, die bekanntermaßen entscheidend für die Rekrutierung der ESCRT-Komplexe und die anschließende Sortierung retroviraler Gag-Proteine und filo- und rhabdoviraler M-Proteine sind, wurden in MV-Proteinen bislang nicht definiert. Die Tatsache, dass MV M-Proteine die Produktion von VLPs vermitteln, lässt auf die Existenz wenigstens einer funktionellen L-Domäne schließen (Abb. 4.8-10, 4.12-13). Potenzielle Kandidaten sind die beiden hochkonservierten Motive YMFL an Position 52-55 und PSVP an Position 311-314, die mit den zellulären Proteinen AIP-1/ALIX bzw. Tsg101 interagieren könnten. Eine kürzlich beschriebene paramyxovirale L-Domäne mit dem Sequenzmotiv FPIV ist in der MV M-Proteinsequenz nicht zu finden (Schmitt et al., 2005).

Die Expression der M-, F- und H-Proteine katalysierte die Entstehung von VLPs aus 293-Zellen. Wurden F- und M-Proteine singular exprimiert, vermittelten sie die Produktion von VLPs, jedoch erhöhte sich die Menge der in den Überstand freigesetzten Proteine nicht signifikant bei Koexpression dieser Proteine (Abb. 4.11). Interessanterweise korrespondierte der Prozentsatz im Überstand befindlicher M- und F-Proteine fast genau mit dem aus infizierten Zellen freigesetzter Virionen (Abb. 4.11). Dies zeigt einerseits, dass beide Proteine unabhängig voneinander zur Produktion von VLPs fähig sind und bestätigt andererseits die Ineffizienz der Virusfreisetzung. Im Gegensatz dazu verstärkt die Koexpression des Glykoproteins des Ebolavirus die VP40-getriebene VLP-Produktion (Licata et al., 2004). In den hier dargestellten Experimenten konnten keine stammspezifischen Unterschiede bezüglich der VLP-Freisetzung festgestellt werden und auch die VLP-Produktion bei heterologer Expression der M- oder F- und H-Proteine unterschiedlichen Ursprungs (WTF oder ED) war ebenso effizient wie bei homologer Expression.

In den elektronenmikroskopischen Immunlokalisationsexperimenten konnte in doppelt transfizierten Zellen wegen fehlender Reagenzien lediglich das Vorhandensein von M-Protein in den entstehenden Partikeln nachgewiesen werden (Abb. 4.13), Es konnte nicht untersucht werden, ob sie auch F-Protein enthielten. Durchschnittlich erschienen die von den beiden Proteinen induzierten VLPs kleiner als die knospenden Viruspartikel. Aufgrund der bestehenden Möglichkeit, dass die Partikel bei der elektronenmikroskopischen Untersuchung in unterschiedlichen Ebenen geschnitten wurden, ist es jedoch notwendig, eine weitaus größere Anzahl knospender Strukturen zu analysieren oder idealerweise serielle Schnitte durch einzelne Partikel zu machen, um dies mit Sicherheit festzustellen oder zu widerlegen.

Kooperieren das M- und das F-Protein in der VLP-Produktion auch nicht miteinander, so wirken sie anscheinend hinsichtlich der DRM-Assoziation zusammen. In Übereinstimmung mit früheren Untersuchungen (Manie et al., 2000, Vincent et al., 2000) koflotierte ein Teil der in Zellen exprimierten M- und F-Proteine mit DRMs (Abb. 4.7). Während das F-Protein in der Studie von Manie und Mitarbeitern nicht in der Lage war, das M-Protein in die DRM-

Fraktionen zu rekrutieren, konnte in der vorliegenden Arbeit bei stabiler Koexpression des heterologen oder homologen F-Proteins ein etwa vierfacher Anstieg der Menge mit DRMs assoziierten M-Proteins festgestellt werden (Abb. 4.7 (C)). Ein vergleichbares Ergebnis lieferte die transiente Koexpression beider Proteine. Die beobachtete Diskrepanz könnte auf die voneinander abweichenden Expressionssysteme zurückzuführen sein. Während in der Studie von Manie rekombinante Vakziniaviren verwendet wurden, so erfolgte in der vorliegenden Arbeit die Expression Plasmid-basiert.

Kürzlich konnte gezeigt werden, dass der zytoplasmatische Teil des F-Proteins des humanen respiratorischen Synzyzialvirus für die Partikelfreisetzung wichtig ist sowie die intrazelluläre Verteilung des Proteins und dessen Assoziation mit DRMs beeinflusst (Oomens et al., 2006). Inwiefern der zytoplasmatische Anteil des MV F-Proteins zur Rekrutierung des M-Proteins in die DRMs beiträgt, konnte nicht festgestellt werden. Das verfügbare Antiserum erkennt den zytoplasmatischen Anteil des F-Proteins, was es unmöglich macht, MV F-Proteine mit fehlender zytoplasmatischer Domäne im Western Blot zu untersuchen. Für das MV F-Protein wurde eine Palmitoylierung nachgewiesen, die an einer zur Transmembrandomäne gehörenden Aminosäure erfolgt (Caballero et al., 1998). Es ist bekannt, dass Proteine, die eine solche Modifikation tragen, mit DRMs assoziieren (Paige et al., 1993, Robbins et al., 1995, Shenoy-Scaria et al., 1994, Yurchak & Sefton, 1995). Deswegen ist es möglich, dass das F-Protein aufgrund der Palmitoylierung in DRMs rekrutiert wird. Um diese Hypothese zu prüfen, ist es erforderlich, durch zielgerichtete Mutation die Palmitoylierungsstelle zu verändern, dadurch die Palmitoylierung zu verhindern und nachfolgend die DRM-Assoziationsfähigkeit zu untersuchen.

Der beobachtete Unterschied zwischen der Fähigkeit des F-Proteins, das M-Protein zu den DRMs zu rekrutieren, und der Unabhängigkeit beider Proteine voneinander in der VLP-Produktion lässt sich möglicherweise mit der zur Isolierung der DRMs verwendeten Methode erklären. Die mit der Standardmethode isolierten DRMs enthalten sowohl die inneren Membranen als auch die Plasmamembranen, wohingegen die MV-Partikelmorphogenese in

Fibroblasten nur an äußeren Membranen stattfindet. Weiterhin ist bekannt, dass die Virusfreisetzung nicht strikt auf DRMs beschränkt ist, da ein rekombinantes MV, dessen Glykoproteine gegen das nicht DRM-assoziierte Glykoprotein G des VSV ausgetauscht wurden, freigesetzt wird (Vincent et al., 1999). Eine Charakterisierung der freigesetzten Viruspartikel ergab, dass kein M-Protein in die entstehenden Partikel verpackt wird (Spielhofer et al., 1998), was die Annahme unterstützt, dass die Knospung nicht ausschließlich DRM- und M-Protein-abhängig ist.

Wie ihre orthologen M- und F-Proteine, so können auch die M- und F-Proteine des Simianvirus 5 die Entstehung von VLPs katalysieren (Takimoto & Portner, 2004). Ein in den zytoplasmatischen Domänen von Sendaivirus und humanem Parainfluenzavirus konserviertes Sequenzmotiv (TYTLE) wurde als essentiell für die Partikelmorphogenese identifiziert (Takimoto et al., 2001), ist allerdings nicht in den zytoplasmatischen Teilen der MV-Glykoproteine F und H zu finden. Die Domänen, die in den MV-Proteinen für diese Aktivität wichtig sind, müssen in nachfolgenden Experimenten untersucht werden.

Bemerkenswerterweise sind das M-Protein, das H-Protein und noch häufiger der zytoplasmatische Anteil des F-Proteins in persistierenden Infektionen des Gehirns, die durch fehlende Produktion infektiöser Partikel gekennzeichnet sind, oft von Mutationen betroffen (Baczko et al., 1993, Cathomen et al., 1998b, Cattaneo et al., 1986). Zudem ist das Expressionsniveau der F- und H-Proteine aufgrund der geringen Frequenz der korrespondierenden mRNAs in diesen Zellen sehr niedrig, was ebenfalls zu einer defekten Partikelmorphogenese beitragen könnte (Cattaneo et al., 1987a, Cattaneo et al., 1987b). Die Tatsache, dass sowohl das M-Protein als auch die beiden Glykoproteine F und H unabhängig voneinander die Bildung von VLPs fördern (Abb. 4.8-10, 4.12-13), belegt ihre Bedeutung für die Virusknospung und erklärt darüber hinaus, weshalb ein rekombinantes M-Protein-freies MV, wenn auch sehr ineffizient, knospt und replikationsfähig ist.

DCs sind sowohl mit MV Wildtyp- als auch mit Vakzinestämmen infizierbar, allerdings zeigt sich eine Restriktion der Virusinfektion, da trotz der Expression aller viralen Proteine kaum infektiöse Viruspartikel produziert werden (Fugier-Vivier et al., 1997, Servet-Delprat et al., 2000). Ein solches Phänomen der Restriktion ist auch für andere Viren wie Herpes-Simplex-Virus und Sendaivirus bereits beschrieben (McWilliam et al., 1997, Samady et al., 2003).

Eine Restriktion in der Partikelfreisetzung entstehender MV-Partikel wurde für murine L-Zellen beschreiben, die stabil CD46 als MV-Rezeptor exprimieren. In diesen Zellen werden zwar alle viralen Proteine synthetisiert, jedoch werden aus ihnen nur geringe Virusmengen freigesetzt. Die erhobenen Daten sprechen für einen Defekt in einem späten Schritt der Virusmorphogenese (Vincent et al., 1999). Dies ist allerdings nicht durch Auffälligkeiten in der Sortierung viraler Proteine, sondern vielmehr durch eine ineffiziente Abschnürung von Partikeln von der Zelloberfläche bedingt, die von einer Akkumulation viraler Proteine und Nukleokapside an der Membran begleitet wird. Aufgrund dieser Unterschiede mögen die Ursachen im Einzelfall voneinander divergieren. Dennoch unterstützt auch die in der Studie von Vincent und Mitarbeitern gemachte Beobachtung, dass die freigesetzten Viruspartikel reduzierte Mengen an M-, F- und H-Proteinen enthielten, die Bedeutung dieser Proteine für die Partikelbildung.

Eine denkbare Erklärung für die beobachtete Restriktion der Virusproduktion könnte sein, dass in semipermissiven Zellen wie DCs eine abweichende Proteinsortierung stattfindet. Ein Beispiel für alternativen Proteintransport in spezialisierten Zelltypen ist die Sortierung von MV-Proteinen zur apikalen oder basolateralen Membrandomäne in polarisierten Epithelzellen (Maisner et al., 1998, Moll et al., 2001). In diesem Fall wird das M-Protein zur apikalen Membrandomäne transportiert, wo die Viruspartikel freigesetzt werden, während die beiden Glykoproteine F und H eine nicht-polarisierte bzw. eine basolaterale Verteilung aufweisen (Maisner et al., 1998). Offensichtlich bestimmt damit das M-Protein den Ort der Partikelentstehung.

Die in der vorliegenden Arbeit durchgeführten Untersuchungen zur Aufklärung möglicher Unterschiede zwischen semipermissiven, nicht produktiv infizierbaren DCs unterschiedlicher Reifungszustände und der permissiven,

produktiv infizierbaren Fibroblastenzelllinie HeLa zeigten drastische Unterschiede in der intrazellulären Lokalisation der untersuchten M-, H- und N-Proteine (Abb. 4.14-21).

Diese auffälligen Abweichungen in der subzellulären Verteilung der MV-Proteine sowie deren nachgewiesene Assoziation mit endosomalen Kompartimenten, die sich in DCs von denen in HeLa-Zellen unterscheiden, könnten entweder durch zelltypspezifische Sortierungsmechanismen erklärt werden. Weiterhin besteht die Möglichkeit, dass in DCs andere zelluläre Proteine mit den MV-Proteinen interagieren als in HeLa-Zellen. Da in DCs der Transport von Proteinen von der Zelloberfläche und die nachfolgende Prozessierung für die MHC-Klasse-II-abhängige Antigenpräsentation mit Hilfe des endosomalen Systems erfolgt, sind die daran beteiligten Organellen besonders ausgeprägt und divers (Haigler et al., 1979, Katzmann et al., 2002).

Die MV-Infektion selbst könnte die Aktivität und Dynamik der endosomalen Sortierungsmaschinerie verändern, die durch die MV-induzierte Ausreifung der DCs bedingt wird. Es wäre denkbar, dass es sich dabei um einen generellen ausreifungsgesteuerten Mechanismus handelt, der in DCs wirksam ist und nicht MV-spezifisch ist. Die Ausreifung von DCs bewirkt, dass peptidbeladene MHC-Klasse-II-Moleküle an die Zelloberfläche transportiert werden. Dabei transformieren die endosomalen Kompartimente oft zu tubulären Strukturen, die entlang von Mikrotubuli an die Zelloberfläche gelangen und dort mit der Zytoplasmamembran fusionieren (Boes et al., 2004, Chow & Mellman, 2005, Pohl Lehmann et al., 2006).

Das Resultat könnte letztendlich eine Anhäufung der MV-Proteine in speziellen zellulären Kompartimenten in den DCs anstatt des korrekten Zusammenbaus infektiöser Nachkommenvirionen an der Zelloberfläche sein. Dabei müssten nicht alle viralen Proteine abweichend sortiert werden. Es könnte ausreichen, wenn einzelne Proteine wie das M-Protein aberrant verteilt wären.

Bei den nachgewiesenen viralen Proteinen handelte es sich um Proteine, die neu synthetisiert wurden, und nicht um Virusproteine, die von dem ursprünglich zur Infektion eingesetzten internalisierten Virus stammten. Belege dafür sind der Anstieg der viralen Proteinexpression im zeitlichen Infektionsverlauf sowie

die Tatsache, dass die Infektion von DCs mit einem rekombinanten MV, das als zusätzliche Transkriptionseinheit ein Gen für das grün-fluoreszierende Protein EGFP kodiert, zur Expression des EGFPs führen (de Witte et al., 2006).

In Kulturen infizierter DCs kommt es zur F- und H-Protein-vermittelten Zell-Zell-Fusion infizierter Zellen mit benachbarten Zellen. Dies belegt, dass die F- und H-Proteine zumindest partiell richtig sortiert werden und die Zelloberfläche erreichen. Somit kann sich die Infektion auch bei mangelnder Partikelproduktion zumindest bedingt von Zelle zu Zelle ausbreiten.

Während in den HeLa-Zellen das M-Protein nur partiell mit dem H- bzw. N-Protein kolokalisierte und vor allem das H-, aber auch das M-Protein in Assoziation mit der Plasmamembran vorlagen, akkumulierten in DCs die MV-Proteine nahezu vollständig in größeren intrazellulären Aggregaten. Besonders ausgeprägt war dies in LPS-ausgereiften DCs. Signifikante virusstamm-spezifische Differenzen waren nicht zu beobachten. Dies zeigt, dass Unterschiede in der Proteinverteilung bestehen, die wahrscheinlich auf Abweichungen im Proteintransport und in der Proteinsortierung hindeuten.

Es wäre möglich, dass die MV-Proteine in DCs nach der Synthese in DALIS akkumulieren. Diese entstehen transient während der Ausreifung der DCs, z. B. durch LPS, und spielen beim Proteinabbau für die MHC-Klasse-I-abhängige Antigenpräsentation eine Rolle (Lelouard et al., 2002). Sie enthalten Proteine des Ubiquitin-Konjugationssystems und ubiquitinierte Proteine, die anscheinend kontrolliert für die MHC-Klasse-I-abhängige Antigenpräsentation abgebaut werden. Da DALIS reifungsabhängig entstehen, ist es wahrscheinlich, dass sie auch in Virus-infizierten DCs entstehen. Dies konnte bisher nur für das Influenza-A-Virus gezeigt werden. In den in infizierten DCs nachweisbaren DALIS lagen virale Proteine vor (Herter et al., 2005). DALIS könnten somit auch in der MV-induzierten DC-Ausreifung entstehen, so dass ihre Bildung möglicherweise das Auftreten der in der vorliegenden Arbeit beschriebenen MV-Protein-haltigen Aggregate erklärt. Versuchsansätze, die dies aufklären könnten, umfassen die Kodetektion von ubiquitinierten Proteinen und Virusproteinen in infizierten DCs.

Die hier dargestellten Ergebnisse zeigen, dass die MV-Proteine in HeLa-Zellen mit Membrankompartimenten verschiedener Größe assoziieren, unter anderem mit den Fraktionen, die Membranen von Zellorganellen wie Endosomen und ER enthalten (Abb. 4.6). Für das M-Protein konnte eine Kolo-kalisation mit Lamp-1-positiven späten Endosomen nachgewiesen werden (Abb. 4. 24), die sich für die Proteine H und N nicht zeigen ließ. Anders als in diesen Zellen kolo-kalisierte in den DCs keines der MV-Proteine mit diesem Kompartiment (Abb. 4.25-27), stattdessen jedoch überwiegend mit einem anderen MVB/spät endosomalen Kompartiment, das reich an dem Tetraspanin CD81 ist (Abb. 4.28-29).

Darüber hinaus geben die Resultate einen ersten Hinweis auf die Lokalisation der MV-Proteine in DCs, beantworten jedoch die Frage nach der Natur dieser Aggregate nicht. Abbildung 5.1 stellt potenzielle Transportwege der MV-Proteine innerhalb von DCs vor. Dabei werden Ereignisse, die mit der MHC-Klasse-II-abhängigen Antigenpräsentation in Zusammenhang stehen, wie die Aufnahme von Viruspartikeln durch Endozytose, die anschließende Degradation in endosomalen Kompartimenten und die Beladung der MHC-Klasse-II-Moleküle gezeigt. Dargestellt ist zudem die mögliche Aggregation viraler Proteine in DALIS, die zur MHC-Klasse-I-abhängigen Antigenpräsentation führt, oder alternativ dazu ein denkbare Modell zur Erklärung der Assoziation von MV-Proteinen mit Tetraspanin-haltigen MVBs, die eventuell MHC-Klasse-II-Moleküle enthalten. Der Transport der Glykoproteine vom Golgi-Apparat zu den MVBs erfolgt mittels gerichtetem Vesikeltransport, der unter Umständen Rab9-abhängig sein könnte. Denkbar ist, dass Viruspartikel, vollständig oder defekt, oder Mischpartikel aus Exosomen und Virionen in das MVB-Kompartiment knospen. Anschließend erfolgt der Transport über Lysosomen, die der Ort sind, an dem die MHC-Klasse-II-Moleküle mit Peptiden für die Antigenpräsentation beladen werden. Anschließend kommt es zur Tubulierung des endosomalen Kompartiments und zur Fusion mit der Zytoplasmamembran. Dabei werden interne Vesikel, wie Exosomen, aber unter Umständen auch Viruspartikel, in gleicher Weise freigesetzt und es kommt zur Präsentation der Antigene auf der Zelloberfläche.



In weiteren Versuchen soll mittels Elektronenmikroskopie aufgeklärt werden, ob die Tetraspanin-haltigen endosomalen Kompartimente lediglich virale Proteine oder aber virale Partikel enthalten, was eine Knospung in diese Kompartimente implizieren würde. Es ist durchaus denkbar, dass MV-Partikel in dieses Kompartiment knospen, wie für HIV in Makrophagen gezeigt wurde (Pelchen-Matthews et al., 2003). Dies muss nicht notwendigerweise bedeuten, dass dabei infektiöse Partikel entstehen. Es könnte eventuell auch zur Bildung defekter, nicht infektiöser Partikel führen. Solche Partikel könnten beispielsweise Mischpartikel aus MHC-Klasse-II-haltigen internen Vesikeln in MVBs sein, was zu einer verringerten Infektiosität führen könnte. Dass in den Zellen kaum Zell-assoziiertes infektiöses Virus nachweisbar war, spricht gegen die Möglichkeit, dass die CD81-positiven spät endosomalen Kompartimente vollständige Viruspartikel enthalten. Die in dieser Arbeit gezeigten Befunde implizieren in jedem Fall, dass solche nicht infektiösen oder vermindert infektiöse Partikel vorkommen.

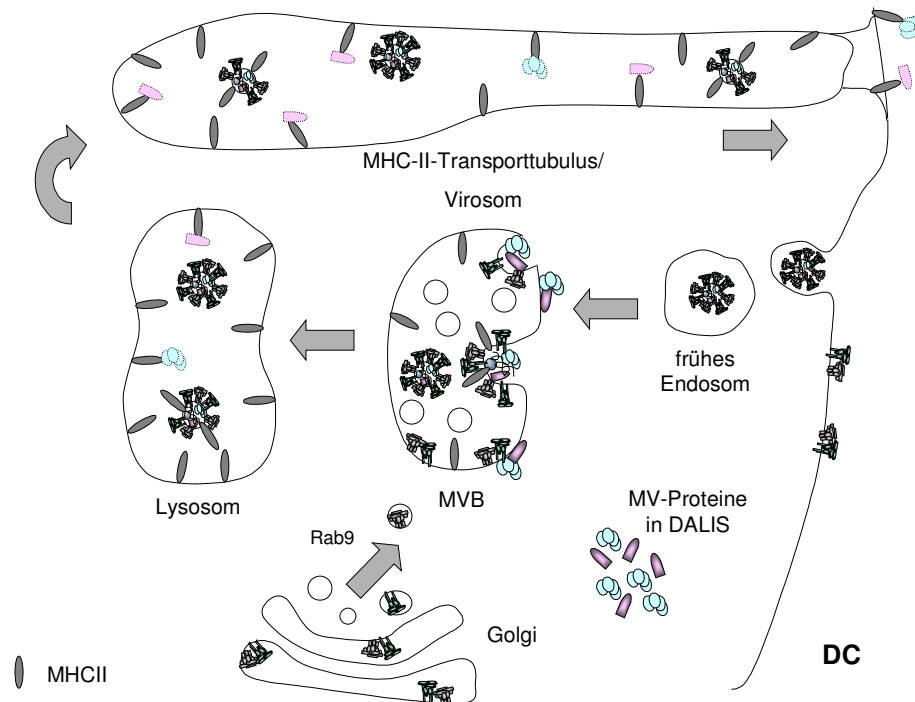
Unter Umständen könnte auch die gewählte Methode zum Aufschluss der Zellen (durch Gefrieren und Auftauen) nicht ausreichend sein, um die Partikel aus einem intrazellulären Kompartiment freizusetzen. Ein Experiment, in dem die DCs nach der Infektion mittels Homogenisator aufgeschlossen werden, könnte dies beantworten.

Bereits zuvor konnte gezeigt werden, dass retrovirale Partikel in Makrophagen in ein Tetraspanin-haltiges endosomales Kompartiment knospen, das auch als Virosom bezeichnet wird und ein spezialisiertes Kompartiment zu sein scheint (Pelchen-Matthews et al., 2003). In DCs eintretende HIV-1-Partikel werden in ein sehr ähnliches Kompartiment transportiert (Garcia et al., 2005).

Dies findet im Gegensatz dazu in anderen Zelltypen wie HeLa- und T-Zellen nicht an der Zytoplasmamembran statt (Nguyen et al., 2003, Ono et al., 2004, Raposo et al., 2002). Entscheidend für die Festlegung des Knospungsortes ist die Lokalisation verschiedener zellulärer Proteine aber auch des retroviralen Gag-Proteins, die durch Phosphatidylinositol-(4, 5)-bisphosphat kontrolliert wird (Ono et al., 2004). Unterschiede in der intrazellulären Verteilung dieses

Phosphatidinosids könnten diese Abweichungen im Transport viraler Proteine in verschiedenen Zelltypen erklären. Ähnliches könnte auch für den MV-Proteintransport zutreffen und einen Anteil an der Redistribution der MV-Proteine in DCs haben.

In einer anderen Studie konnte gezeigt werden, dass die zelluläre GTPase Rab9, die an der Regulation des Vesikeltransports von Endosomen zum Trans-Golgi-Netzwerk benötigt wird, für die Produktion von MV-, HIV-1- und Filovirus-Viruspartikeln wichtig ist (Murray et al., 2005). Dieser Befund belegt die Involvierung von Vesikeltransportmechanismen in die Partikelmorphogenese und könnte in DCs abweichend sein. Frühere Arbeiten zeigen, dass Rab-GTPasen auch in DCs in den endosomalen Vesikeltransport involviert sind. Eine Studie, in der die Proteinzusammensetzung von aus murinen DCs sezernierten Exosomen analysiert wurde, zeigt, dass diese die GTPasen Rab7 und Rab11 enthalten, die den Vesikelverkehr von frühen Endosomen zur Zelloberfläche regulieren (Thery et al., 2001). In Langerhanszellen, den Vertretern der DC-Linie in der Epidermis, kolokalisiert CD1a mit der kleinen GTPase Rab11. Dieser Transport scheint für die effiziente CD1a-abhängige Antigenpräsentation von Lipiden und Glykolipiden wichtig zu sein (Salamero et al., 2001).



**Abbildung 5.1: Hypothetisches Modell des MV-Protein-Transports in DCs.**

Bei dem in dieser Arbeit identifizierten MV-Protein-haltigen CD81-positiven spät endosomalen Kompartiment könnte es sich um MIICs handeln, die an der MHC-Klasse-II-abhängigen Antigenpräsentation beteiligt und charakteristisch für DCs sind (Geuze, 1998, Neefjes et al., 1990). Ein Merkmal von MIICs ist, dass sie Tetraspanine wie CD63, CD81 und CD82 enthalten. Während der Ausreifung der DCs tubulieren diese Kompartimente, werden retrograd-endosomal zur Zytoplasmamembran transportiert und fusionieren dort mit ihr (Escola et al., 1998). Auf diese Weise gelangen Peptid-beladene MHC-Klasse-II-Moleküle an die Zelloberfläche. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde lediglich die Kolo-kalisation von MV-Proteinen mit CD81 nachgewiesen, nicht jedoch, ob dieses Kompartiment auch MHC-Klasse-II-Moleküle enthält. Ob das der Fall ist, sollte Gegenstand weiterführender Untersuchungen sein, kann aber als durchaus wahrscheinlich gelten.

Eine Hypothese zur Erklärung der gezeigten Kolo-kalisation mit dem spät endosomalen Tetraspanin-haltigen MVB-Kompartiment kann sein, dass

Viruspartikel als interne Vesikel in dieses Kompartiment knospen und während der Tubulierung dieses Kompartiments und der anschließenden Rückfusion mit der Zytoplasmamembran im Zuge der Antigenpräsentation freigesetzt werden. Auf diese Weise könnten die Viruspartikel über die sich zwischen DCs und T-Zellen ausbildende immunologische Synapse auf T-Zellen übertragen werden und zu deren Infektion führen.

In einer früheren Studie wurde eine sogenannte virologische Synapse beschrieben, die sich zwischen T-Zellen ausbildet und über die Viren wie das humane T-Zell-Leukämievirus-1 (HTLV-1) übertragen werden (Nejmeddine et al., 2005). Sie ähnelt in ihrer Natur stark der immunologischen Synapse, die im Rahmen der Antigenpräsentation zwischen T-Zellen und DCs ausgebildet wird. Sie enthält verschiedene kostimulatorische Moleküle, die für eine effiziente Stimulation der T-Zellen durch die Ligation des T-Zellrezeptors durch Antigen-beladene MHC-Klasse-II-Moleküle erforderlich sind (Kiefer et al., 2002). Es ist durchaus möglich, dass die immunologische Synapse, die sich zwischen DCs und T-Zellen ausbildet, identisch mit der virologischen Synapse ist bzw. als solche fungiert. Eine weitere Charakterisierung des Kompartiments, das die MV-Proteine enthält, steht aus. Dabei könnte festgestellt werden, ob es sich um klassische MIICs handelt oder um davon zu unterscheidende Virosomen.

Mit Sicherheit benutzt das Virus, ebenso wie es für alle Schritte seines Lebenszyklus auf zelluläre Maschinerien angewiesen ist, auch für den intrazellulären Transport in der Zelle bestehende Sortierungsmechanismen. Aufzuklären bleibt, welche dies sind und ob und wie das Virus diese eventuell in für sich geeigneter Weise modifiziert.

## 6 Zusammenfassung

Die Morphogenese von Viruspartikeln und deren Freisetzung aus infizierten Zellen sind späte Schritte im viralen Lebenszyklus. Matrix-Proteine (M) negativ-strängiger RNA-Viren und Retroviren, bei denen es sich um periphere Membran-assoziierte Proteine handelt, spielen für diese Prozesse eine besonders wichtige Rolle. Im Verlauf der Masernvirus (MV)-Infektion interagiert das M-Protein mit dem viralen Nukleoproteinkomplex im Innern der Viruspartikel einerseits und mit den viralen Glykoproteinen auf der Oberfläche andererseits. Die Bedeutung des MV M-Proteins für die Partikelproduktion und sein intrazellulärer Transport wurden bislang wenig untersucht.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass das MV M-Protein in höhermolekularen Komplexe oligomerisiert und transient mono-ubiquitiniert vorliegt. Beide biochemischen Eigenschaften des M-Proteins sind wahrscheinlich für die Partikelentstehung von Bedeutung, wie durch Studien an M-Protein-Orthologen anderer Viren bereits belegt wurde. Das MV M-Protein assoziierte mit Membranen und speziellen Membranmikrodomänen, sogenannten Detergenz-resistenten Membranfraktionen (DRMs), und vermittelte nach transienter Expression in Fibroblasten die Produktion Virus-ähnlicher Partikel (*virus-like particles*, VLPs). Es ist beschrieben, dass umhüllte Viren präferenziell aus DRMs freigesetzt werden. Die Koexpression des MV-Glykoproteins F erhöhte den Anteil mit DRM-assoziierten M-Proteins um ein Vierfaches, steigerte jedoch, wie auch das H-Protein, die Effizienz der VLP-Freisetzung nicht. Überraschenderweise waren beide jedoch selbst in der Lage VLPs zu induzieren. Die Effizienz der VLP-Produktion war gering und entsprach der der Viruspartikelfreisetzung.

Dendritische Zellen (DCs) sind für MV semipermissiv. Obwohl alle viralen Proteine synthetisiert werden, wird kein infektiöses Virus freigesetzt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die intrazelluläre Lokalisation der M-, H- und N-Proteine dramatisch von der in der produktiv infizierbaren Fibroblastenzelllinie HeLa abweicht. Während in infizierten HeLa-Zellen das M-Protein mit

Lamp-1-positiven späten Endosomen kolokalisierte, akkumulierten in DCs alle untersuchten viralen Proteine in einem spät endosomalen Kompartiment, das das Tetraspanin CD81, aber nicht Lamp-1, enthielt und möglicherweise an der MHC-Klasse-II-abhängigen Antigenpräsentation beteiligt ist.

## 7 Summary

Morphogenesis of viral particles and their release from infected cells are late steps in viral life cycle. Matrix (M) proteins of negative-stranded RNA viruses and retroviruses, which are peripheral membrane-associated proteins, play a crucial role in these processes.

During measles virus (MV) infection the M protein interacts both with the viral nucleoprotein complex and viral glycoproteins. So far, little is known about the importance of the MV M protein for particle production and its intracellular transport.

This work shows that the MV M protein oligomerises to higher molecular complexes and is transiently mono-ubiquitinated. These biochemical properties of the protein are likely to be of importance for particle formation as has been shown in studies with M protein orthologues of other viruses. The M protein associates with membranes and specialized membrane microdomains, so called detergent-resistant membrane fractions (DRMs), and triggers the production of virus-like particles (VLPs) after transient expression in fibroblasts. It has been described that enveloped viruses preferentially bud from DRMs. Coexpression of the glycoprotein F increased the fraction of M protein associated with DRMs about four-fold, though the efficiency of VLP release was unaffected by coexpressed F and H glycoproteins, respectively. Surprisingly, both glycoproteins individually promoted VLP formation on their own. The efficiency of VLP production was low and corresponded almost exactly to that of viral particles.

Dendritic cells (DCs) are semipermissive to MV infection. Though all viral proteins are synthesized, almost no infectious virus is released indicating a block in a late step of the viral life cycle. This work shows that the intracellular localization of M, H and N proteins differs dramatically from that observed in the productively infectable fibroblast HeLa cell line. While in infected HeLa cells the M protein colocalized with Lamp-1-positive late endosomes, in DCs all investigated viral proteins accumulated in a Lamp-1-negative late endosomal

compartment that contained the tetraspanin CD81, which is potentially involved in MHC class II-loading and antigen presentation.



## 8 Literaturverzeichnis

- Ayata, M., Hirano, A. & Wong, T. C. (1989). Structural defect linked to nonrandom mutations in the matrix gene of biken strain subacute sclerosing panencephalitis virus defined by cDNA cloning and expression of chimeric genes. *J Virol* **63**, 1162-73.
- Babst, M., Sato, T. K., Banta, L. M. & Emr, S. D. (1997). Endosomal transport function in yeast requires a novel AAA-type ATPase, Vps4p. *Embo J* **16**, 1820-31.
- Babst, M., Wendland, B., Estepa, E. J. & Emr, S. D. (1998). The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. *Embo J* **17**, 2982-93.
- Baczko, K., Lampe, J., Liebert, U. G., Brinckmann, U., ter Meulen, V., Pardowitz, I., Budka, H., Cosby, S. L., Isserte, S. & Rima, B. K. (1993). Clonal expansion of hypermutated measles virus in a SSPE brain. *Virology* **197**, 188-95.
- Banchereau, J. & Steinman, R. M. (1998). Dendritic cells and the control of immunity. *Nature* **392**, 245-52.
- Banerjee, A. K. (1987). The transcription complex of vesicular stomatitis virus. *Cell* **48**, 363-4.
- Barois, N., de Saint-Vis, B., Lebecque, S., Geuze, H. J. & Kleijmeer, M. J. (2002). MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation. *Traffic* **3**, 894-905.
- Bellini, W. J., Rota, J. S. & Rota, P. A. (1994). Virology of measles virus. *J Infect Dis* **170 Suppl 1**, S15-23.
- Bieback, K., Lien, E., Klagge, I. M., Avota, E., Schneider-Schaulies, J., Duprex, W. P., Wagner, H., Kirschning, C. J., Ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, S. (2002). Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol* **76**, 8729-36.
- Bleeharski, J. R., Niazi, K. R., Sieling, P. A., Cheng, G. & Modlin, R. L. (2001). Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines. *J Immunol* **167**, 3174-81.
- Blumberg, B. M. & Kolakofsky, D. (1981). Intracellular vesicular stomatitis virus leader RNAs are found in nucleocapsid structures. *J Virol* **40**, 568-76.
- Boes, M., Cuvillier, A. & Ploegh, H. L. (2004). Membrane specialisations and endosome maturation in dendritic cells and B cells. *Trends Cell Biol* **14**, 175-182.
- Bohn, W., Rutter, G., Hohenberg, H., Mannweiler, K. & Nobis, P. (1986). Involvement of actin filaments in budding of measles virus: studies on cytoskeletons of infected cells. *Virology* **149**, 91-106.
- Bolt, G., Pedersen, I. R. & Blixenkrone-Moller, M. (1999). Processing of N-linked oligosaccharides on the measles virus glycoproteins: importance for antigenicity and for production of infectious virus particles. *Virus Res* **61**, 43-51.
- Bonifacino, J. S. & Traub, L. M. (2003). Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**, 395-447.

- Bryant, M. & Ratner, L. (1990). Myristoylation-dependent replication and assembly of human immunodeficiency virus 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**, 523-7.
- Caballero, M., Carabana, J., Ortego, J., Fernandez-Munoz, R. & Celma, M. L. (1998). Measles virus fusion protein is palmitoylated on transmembrane-intracytoplasmic cysteine residues which participate in cell fusion. *J Virol* **72**, 8198-204.
- Calain, P. & Roux, L. (1993). The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *J Virol* **67**, 4822-30.
- Cathomen, T., Mrkic, B., Spehner, D., Drillien, R., Naef, R., Pavlovic, J., Aguzzi, A., Billeter, M. A. & Cattaneo, R. (1998a). A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *Embo J* **17**, 3899-908.
- Cathomen, T., Naim, H. Y. & Cattaneo, R. (1998b). Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol* **72**, 1224-34.
- Cattaneo, R., Kaelin, K., Baczko, K. & Billeter, M. A. (1989). Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. *Cell* **56**, 759-64.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Baczko, K., ter Meulen, V. & Billeter, M. A. (1987a). Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology* **160**, 523-6.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Schmid, A., Baczko, K., ter Meulen, V. & Billeter, M. A. (1987b). Altered transcription of a defective measles virus genome derived from a diseased human brain. *Embo J* **6**, 681-8.
- Cattaneo, R., Schmid, A., Eschle, D., Baczko, K., ter Meulen, V. & Billeter, M. A. (1988). Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections. *Cell* **55**, 255-65.
- Cattaneo, R., Schmid, A., Rebmann, G., Baczko, K., Ter Meulen, V., Bellini, W. J., Rozenblatt, S. & Billeter, M. A. (1986). Accumulated measles virus mutations in a case of subacute sclerosing panencephalitis: interrupted matrix protein reading frame and transcription alteration. *Virology* **154**, 97-107.
- Cella, M., Scheidegger, D., Palmer-Lehmann, K., Lane, P., Lanzavecchia, A. & Alber, G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J Exp Med* **184**, 747-52.
- Chow, A. Y. & Mellman, I. (2005). Old lysosomes, new tricks: MHC II dynamics in DCs. *Trends Immunol* **26**, 72-78.
- Clements, C. J. & Cutts, F. T. (1995). The epidemiology of measles: thirty years of vaccination. *Curr Top Microbiol Immunol* **191**, 13-33.
- Cocks, B. G., Chang, C. C., Carballido, J. M., Yssel, H., de Vries, J. E. & Aversa, G. (1995). A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature* **376**, 260-3.
- Connolly, J. H., Allen, I. V., Hurwitz, L. J. & Millar, J. H. (1967). Measles-virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis. *Lancet* **1**, 542-4.
- Connolly, J. H., Haire, M. & Hadden, D. S. (1971). Measles immunoglobulins in subacute sclerosing panencephalitis. *Br Med J* **1**, 23-5.

- Craven, R. C., Harty, R. N., Paragas, J., Palese, P. & Wills, J. W. (1999). Late domain function identified in the vesicular stomatitis virus M protein by use of rhabdovirus-retrovirus chimeras. *J Virol* **73**, 3359-65.
- Crowley, J. C., Dowling, P. C., Menonna, J., Silverman, J. I., Schuback, D., Cook, S. D. & Blumberg, B. M. (1988). Sequence variability and function of measles virus 3' and 5' ends and intergenic regions. *Virology* **164**, 498-506.
- Dascher, C. C., Hiromatsu, K., Xiong, X., Sugita, M., Buhlmann, J. E., Dodge, I. L., Lee, S. Y., Roura-Mir, C., Watts, G. F., Roy, C. J., Behar, S. M., Clemens, D. L., Porcelli, S. A. & Brenner, M. B. (2002). Conservation of CD1 intracellular trafficking patterns between mammalian species. *J Immunol* **169**, 6951-8.
- de Witte, L., Abt, M., Schneider-Schaulies, S., van Kooyk, Y. & Geijtenbeek, T. B. (2006). Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol* **80**, 3477-86.
- Demirov, D. G. & Freed, E. O. (2004). Retrovirus budding. *Virus Res* **106**, 87-102.
- Devaux, P. & Cattaneo, R. (2004). Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *J Virol* **78**, 11632-40.
- Dorig, R. E., Marcil, A., Chopra, A. & Richardson, C. D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* **75**, 295-305.
- Erlenhofer, C., Wurzer, W. J., Löffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, J. (2001). CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* **75**, 4499-505.
- Escoffier, C., Manie, S., Vincent, S., Muller, C. P., Billeter, M. & Gerlier, D. (1999). Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *J Virol* **73**, 1695-8.
- Escola, J. M., Kleijmeer, M. J., Stoorvogel, W., Griffith, J. M., Yoshie, O. & Geuze, H. J. (1998). Selective enrichment of tetraspan proteins on the internal vesicles of multivesicular endosomes and on exosomes secreted by human B-lymphocytes. *J Biol Chem* **273**, 20121-7.
- Esolen, L. M., Ward, B. J., Moench, T. R. & Griffin, D. E. (1993). Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis* **168**, 47-52.
- Forthal, D. N., Aarnaes, S., Blanding, J., de la Maza, L. & Tilles, J. G. (1992). Degree and length of viremia in adults with measles. *J Infect Dis* **166**, 421-4.
- Freed, E. O. (2002). Viral late domains. *J Virol* **76**, 4679-87.
- Fugier-Vivier, I., Servet-Delprat, C., Rivaller, P., Rissoan, M. C., Liu, Y. J. & Roubardin-Combe, C. (1997). Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J Exp Med* **186**, 813-23.
- Furukawa, K., Ayata, M., Kimura, M., Seto, T., Matsunaga, I., Murata, R., Yamano, T. & Ogura, H. (2001). Hemadsorption expressed by cloned H genes from subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) viruses and

- their possible progenitor measles viruses isolated in Osaka, Japan. *Microbiol Immunol* **45**, 59-68.
- Garcia, E., Pion, M., Pelchen-Matthews, A., Collinson, L., Arrighi, J. F., Blot, G., Leuba, F., Escola, J. M., Demaurex, N., Marsh, M. & Piguët, V. (2005). HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse. *Traffic* **6**, 488-501.
- Gatti, E. & Pierre, P. (2003). Understanding the cell biology of antigen presentation: the dendritic cell contribution. *Curr Opin Cell Biol* **15**, 468-73.
- Gaudin, Y., Sturgis, J., Doumith, M., Barge, A., Robert, B. & Ruigrok, R. W. (1997). Conformational flexibility and polymerization of vesicular stomatitis virus matrix protein. *J Mol Biol* **274**, 816-25.
- Geijtenbeek, T. B., Torensma, R., van Vliet, S. J., van Duijnhoven, G. C., Adema, G. J., van Kooyk, Y. & Figdor, C. G. (2000). Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses. *Cell* **100**, 575-85.
- Geuze, H. J. (1998). The role of endosomes and lysosomes in MHC class II functioning. *Immunol Today* **19**, 282-7.
- Gombart, A. F., Hirano, A. & Wong, T. C. (1995). Nucleoprotein phosphorylated on both serine and threonine is preferentially assembled into the nucleocapsids of measles virus. *Virus Res* **37**, 63-73.
- Gomis-Ruth, F. X., Dessen, A., Timmins, J., Bracher, A., Kolesnikowa, L., Becker, S., Klenk, H. D. & Weissenhorn, W. (2003). The matrix protein VP40 from Ebola virus octamerizes into pore-like structures with specific RNA binding properties. *Structure* **11**, 423-33.
- Gottlinger, H. G., Sodroski, J. G. & Haseltine, W. A. (1989). Role of capsid precursor processing and myristoylation in morphogenesis and infectivity of human immunodeficiency virus type 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**, 5781-5.
- Gottwein, E., Bodem, J., Müller, B., Schmechel, A., Zentgraf, H. & Krausslich, H. G. (2003). The Mason-Pfizer monkey virus PPPY and PSAP motifs both contribute to virus release. *J Virol* **77**, 9474-85.
- Griffin, D. E. & Bellini, W. J. (1996). Measles virus. In *Fields, Knipe, DM. and Howley, P. M. (ed.), Fields Virology. Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia*, 1267-1312.
- Grosjean, I., Caux, C., Bella, C., Berger, I., Wild, F., Banchereau, J. & Kaiserlian, D. (1997). Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J Exp Med* **186**, 801-12.
- Haigler, H. T., McKanna, J. A. & Cohen, S. (1979). Direct visualization of the binding and internalization of a ferritin conjugate of epidermal growth factor in human carcinoma cells A-431. *J Cell Biol* **81**, 382-95.
- Harder, T. C. & Osterhaus, A. D. (1997). Canine distemper virus--a morbillivirus in search of new hosts? *Trends Microbiol* **5**, 120-4.
- Hartlieb, B. & Weissenhorn, W. (2006). Filovirus assembly and budding. *Virology* **344**, 64-70.

- Harty, R. N., Brown, M. E., McGettigan, J. P., Wang, G., Jayakar, H. R., Huibregtse, J. M., Whitt, M. A. & Schnell, M. J. (2001). Rhabdoviruses and the cellular ubiquitin-proteasome system: a budding interaction. *J Virol* **75**, 10623-9.
- Heissmeyer, V. & Rao, A. (2004). E3 ligases in T cell anergy--turning immune responses into tolerance. *Sci STKE* **2004**, pe29.
- Helin, E., Salmi, A. A., Vanharanta, R. & Vainionpaa (1999). Measles virus replication in cells of myelomonocytic lineage is dependent on cellular differentiation stage. *Virology* **253**, 35-42.
- Herter, S., Osterloh, P., Hilf, N., Rechtsteiner, G., Hohfeld, J., Rammensee, H. G. & Schild, H. (2005). Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells. *J Immunol* **175**, 891-8.
- Hilkens, C. M., Kalinski, P., de Boer, M. & Kapsenberg, M. L. (1997). Human dendritic cells require exogenous interleukin-12-inducing factors to direct the development of naive T-helper cells toward the Th1 phenotype. *Blood* **90**, 1920-6.
- Hoenen, T., Volchkov, V., Kolesnikova, L., Mittler, E., Timmins, J., Ottmann, M., Reynard, O., Becker, S. & Weissenhorn, W. (2005). VP40 octamers are essential for Ebola virus replication. *J Virol* **79**, 1898-905.
- Horikami, S. M. & Moyer, S. A. (1995). Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **191**, 35-50.
- Hsu, E. C., Iorio, C., Sarangi, F., Khine, A. A. & Richardson, C. D. (2001). CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology* **279**, 9-21.
- Hu, A. & Norrby, E. (1994). Role of individual cysteine residues in the processing and antigenicity of the measles virus haemagglutinin protein. *J Gen Virol* **75** ( Pt 9), 2173-81.
- Janeway, C. A., Jr. (1992). The immune system evolved to discriminate infectious nonself from noninfectious self. *Immunol Today* **13**, 11-6.
- Janeway, C. A., Jr. & Medzhitov, R. (2002). Innate immune recognition. *Annu Rev Immunol* **20**, 197-216.
- Jayakar, H. R., Murti, K. G. & Whitt, M. A. (2000). Mutations in the PPPY motif of vesicular stomatitis virus matrix protein reduce virus budding by inhibiting a late step in virion release. *J Virol* **74**, 9818-27.
- Jiang, W., Swiggard, W. J., Heufler, C., Peng, M., Mirza, A., Steinman, R. M. & Nussenzweig, M. C. (1995). The receptor DEC-205 expressed by dendritic cells and thymic epithelial cells is involved in antigen processing. *Nature* **375**, 151-5.
- Joshi, S. B., Dutch, R. E. & Lamb, R. A. (1998). A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology* **248**, 20-34.
- Justice, P. A., Sun, W., Li, Y., Ye, Z., Grigera, P. R. & Wagner, R. R. (1995). Membrane vesiculation function and exocytosis of wild-type and mutant matrix proteins of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **69**, 3156-60.
- Kärber, G. (1931). *Archiv für experimentelle Pathologie und Pharmakologie*

- Katzmann, D. J., Babst, M. & Emr, S. D. (2001). Ubiquitin-dependent sorting into the multivesicular body pathway requires the function of a conserved endosomal protein sorting complex, ESCRT-I. *Cell* **106**, 145-55.
- Katzmann, D. J., Odorizzi, G. & Emr, S. D. (2002). Receptor downregulation and multivesicular-body sorting. *Nat Rev Mol Cell Biol* **3**, 893-905.
- Kiefer, F., Vogel, W. F. & Arnold, R. (2002). Signal transduction and co-stimulatory pathways. *Transpl Immunol* **9**, 69-82.
- Kil, S. J., Hobert, M. & Carlin, C. (1999). A leucine-based determinant in the epidermal growth factor receptor juxtamembrane domain is required for the efficient transport of ligand-receptor complexes to lysosomes. *J Biol Chem* **274**, 3141-50.
- Klagge, I. M., ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, S. (2000). Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface. *Eur J Immunol* **30**, 2741-50.
- Kolesnikova, L., Bamberg, S., Berghofer, B. & Becker, S. (2004a). The matrix protein of Marburg virus is transported to the plasma membrane along cellular membranes: exploiting the retrograde late endosomal pathway. *J Virol* **78**, 2382-93.
- Kolesnikova, L., Berghofer, B., Bamberg, S. & Becker, S. (2004b). Multivesicular bodies as a platform for formation of the Marburg virus envelope. *J Virol* **78**, 12277-87.
- Kolesnikova, L., Bugany, H., Klenk, H. D. & Becker, S. (2002). VP40, the matrix protein of Marburg virus, is associated with membranes of the late endosomal compartment. *J Virol* **76**, 1825-38.
- Koplik (1896). The diagnosis of the invasion of measles from a study of exanthema as it appears on the buccal mucous membrane. *Arch Pediatr* **12**, 918-920.
- Lamb, R. A. u. K. (1996). Paramyxoviridae, the viruses and their replication. *in: Fields Virology*, 1177-1204.
- Lelouard, H., Ferrand, V., Marguet, D., Bania, J., Camosseto, V., David, A., Gatti, E. & Pierre, P. (2004). Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins. *J Cell Biol* **164**, 667-75.
- Lelouard, H., Gatti, E., Cappello, F., Gresser, O., Camosseto, V. & Pierre, P. (2002). Transient aggregation of ubiquitinated proteins during dendritic cell maturation. *Nature* **417**, 177-82.
- Licata, J. M., Johnson, R. F., Han, Z. & Harty, R. N. (2004). Contribution of ebola virus glycoprotein, nucleoprotein, and VP24 to budding of VP40 virus-like particles. *J Virol* **78**, 7344-51.
- Liston, P. & Briedis, D. J. (1994). Measles virus V protein binds zinc. *Virology* **198**, 399-404.
- Maisner, A., Klenk, H. & Herrler, G. (1998). Polarized budding of measles virus is not determined by viral surface glycoproteins. *J Virol* **72**, 5276-8.
- Manie, S. N., Debreyne, S., Vincent, S. & Gerlier, D. (2000). Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly. *J Virol* **74**, 305-11.

- Marks, M. S., Woodruff, L., Ohno, H. & Bonifacino, J. S. (1996). Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* **135**, 341-54.
- Martin-Serrano, J., Eastman, S. W., Chung, W. & Bieniasz, P. D. (2005). HECT ubiquitin ligases link viral and cellular PPXY motifs to the vacuolar protein-sorting pathway. *J Cell Biol* **168**, 89-101.
- Martin-Serrano, J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. (2001). HIV-1 and Ebola virus encode small peptide motifs that recruit Tsg101 to sites of particle assembly to facilitate egress. *Nat Med* **7**, 1313-9.
- Martin-Serrano, J., Zang, T. & Bieniasz, P. D. (2003). Role of ESCRT-I in retroviral budding. *J Virol* **77**, 4794-804.
- McNeill, W. (1976). *Plagues and People*. Garden City, NJ, Anchor Press/Doubleday, 329.
- McWilliam, A. S., Marsh, A. M. & Holt, P. G. (1997). Inflammatory infiltration of the upper airway epithelium during Sendai virus infection: involvement of epithelial dendritic cells. *J Virol* **71**, 226-36.
- Medvedev, A. E., Henneke, P., Schromm, A., Lien, E., Ingalls, R., Fenton, M. J., Golenbock, D. T. & Vogel, S. N. (2001). Induction of tolerance to lipopolysaccharide and mycobacterial components in Chinese hamster ovary/CD14 cells is not affected by overexpression of Toll-like receptors 2 or 4. *J Immunol* **167**, 2257-67.
- Miller, D. M., Cebulla, C. M. & Sedmak, D. D. (2002). Human cytomegalovirus inhibition of major histocompatibility complex transcription and interferon signal transduction. *Curr Top Microbiol Immunol* **269**, 153-70.
- Miyajima, N., Takeda, M., Tashiro, M., Hashimoto, K., Yanagi, Y., Nagata, K. & Takeuchi, K. (2004). Cell tropism of wild-type measles virus is affected by amino acid substitutions in the P, V and M proteins, or by a truncation in the C protein. *J Gen Virol* **85**, 3001-6.
- Moll, M., Klenk, H. D., Herrler, G. & Maisner, A. (2001). A single amino acid change in the cytoplasmic domains of measles virus glycoproteins H and F alters targeting, endocytosis, and cell fusion in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **276**, 17887-94.
- Moll, M., Klenk, H. D. & Maisner, A. (2002). Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses. *J Virol* **76**, 7174-86.
- Moyer, S. A., Baker, S. C. & Horikami, S. M. (1990). Host cell proteins required for measles virus reproduction. *J Gen Virol* **71** ( Pt 4), 775-83.
- Murk, J. L., Stoorvogel, W., Kleijmeer, M. J. & Geuze, H. J. (2002). The plasticity of multivesicular bodies and the regulation of antigen presentation. *Semin Cell Dev Biol* **13**, 303-11.
- Murray, J. L., Mavrakis, M., McDonald, N. J., Yilla, M., Sheng, J., Bellini, W. J., Zhao, L., Le Doux, J. M., Shaw, M. W., Luo, C. C., Lippincott-Schwartz, J., Sanchez, A., Rubin, D. H. & Hodge, T. W. (2005). Rab9 GTPase is required for replication of human immunodeficiency virus type 1, filoviruses, and measles virus. *J Virol* **79**, 11742-51.
- Naim, H. Y., Ehler, E. & Billeter, M. A. (2000). Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *Embo J* **19**, 3576-85.

- Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T. F., Rossi, B., Rabourdin-Combe, C. & Gerlier, D. (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol* **67**, 6025-32.
- Neefjes, J. J., Stollorz, V., Peters, P. J., Geuze, H. J. & Ploegh, H. L. (1990). The biosynthetic pathway of MHC class II but not class I molecules intersects the endocytic route. *Cell* **61**, 171-83.
- Nejmeddine, M., Barnard, A. L., Tanaka, Y., Taylor, G. P. & Bangham, C. R. (2005). Human T-lymphotropic virus, type 1, tax protein triggers microtubule reorientation in the virological synapse. *J Biol Chem* **280**, 29653-60.
- Nguyen, D. G., Booth, A., Gould, S. J. & Hildreth, J. E. (2003). Evidence that HIV budding in primary macrophages occurs through the exosome release pathway. *J Biol Chem* **278**, 52347-54.
- Nussbaum, O., Broder, C. C., Moss, B., Stern, L. B., Rozenblatt, S. & Berger, E. A. (1995). Functional and structural interactions between measles virus hemagglutinin and CD46. *J Virol* **69**, 3341-9.
- Ohgimoto, S., Ohgimoto, K., Niewiesk, S., Klagge, I. M., Pfeuffer, J., Johnston, I. C., Schneider-Schaulies, J., Weidmann, A., ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, S. (2001). The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro. *J Gen Virol* **82**, 1835-44.
- Ono, A., Ablan, S. D., Lockett, S. J., Nagashima, K. & Freed, E. O. (2004). Phosphatidylinositol (4,5) bisphosphate regulates HIV-1 Gag targeting to the plasma membrane. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**, 14889-94.
- Oomens, A. G., Bevis, K. P. & Wertz, G. W. (2006). The cytoplasmic tail of the human respiratory syncytial virus F protein plays critical roles in cellular localization of the F protein and infectious progeny production. *J Virol* **80**, 10465-77.
- Paige, L. A., Nadler, M. J., Harrison, M. L., Cassady, J. M. & Geahlen, R. L. (1993). Reversible palmitoylation of the protein-tyrosine kinase p56lck. *J Biol Chem* **268**, 8669-74.
- Pal, R., Reitz, M. S., Jr., Tschachler, E., Gallo, R. C., Sarngadharan, M. G. & Veronese, F. D. (1990). Myristoylation of gag proteins of HIV-1 plays an important role in virus assembly. *AIDS Res Hum Retroviruses* **6**, 721-30.
- Palosaari, H., Parisien, J. P., Rodriguez, J. J., Ulane, C. M. & Horvath, C. M. (2003). STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *J Virol* **77**, 7635-44.
- Panchal, R. G., Ruthel, G., Kenny, T. A., Kallstrom, G. H., Lane, D., Badie, S. S., Li, L., Bavari, S. & Aman, M. J. (2003). In vivo oligomerization and raft localization of Ebola virus protein VP40 during vesicular budding. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**, 15936-41.
- Patnaik, A., Chau, V. & Wills, J. W. (2000). Ubiquitin is part of the retrovirus budding machinery. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13069-74.
- Patterson, J. B., Thomas, D., Lewicki, H., Billeter, M. A. & Oldstone, M. B. (2000). V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *Virology* **267**, 80-9.



- Pelchen-Matthews, A., Kramer, B. & Marsh, M. (2003). Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages. *J Cell Biol* **162**, 443-55.
- Pellegrino, M. A., Ferrone, S. & Theofilopoulos, A. N. (1976). Isolation of human T and B lymphocytes by rosette formation with 2-aminoethylisothiquonium bromide (AET) -treated sheep red blood cells with monkey red blood cells. *J Immunol Methods* **11**, 273-9.
- Plempner, R. K., Hammond, A. L. & Cattaneo, R. (2001). Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **276**, 44239-46.
- Pohl Lehmann, C., Shishkova, J. & Schneider-Schaulies, S. (2006). Viruses and dendritic cells: enemy mine. *Cell Microbiol in press*.
- Punnonen, J., Cocks, B. G., Carballido, J. M., Bennett, B., Peterson, D., Aversa, G. & de Vries, J. E. (1997). Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. *J Exp Med* **185**, 993-1004.
- Raposo, G., Moore, M., Innes, D., Leijendekker, R., Leigh-Brown, A., Benaroch, P. & Geuze, H. (2002). Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments. *Traffic* **3**, 718-29.
- Reggiori, F. & Pelham, H. R. (2001). Sorting of proteins into multivesicular bodies: ubiquitin-dependent and -independent targeting. *Embo J* **20**, 5176-86.
- Richardson, C. D., Scheid, A. & Choppin, P. W. (1980). Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides. *Virology* **105**, 205-22.
- Riedl, P., Moll, M., Klenk, H. D. & Maisner, A. (2002). Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. *Virus Res* **83**, 1-12.
- Riley, E. C., Murphy, G. & Riley, R. L. (1978). Airborne spread of measles in a suburban elementary school. *Am J Epidemiol* **107**, 421-32.
- Rima, B. K. (1983). The proteins of morbilliviruses. *J Gen Virol* **64 (Pt 6)**, 1205-19.
- Rima, B. K. & Duprex, W. P. (2005). Molecular mechanisms of measles virus persistence. *Virus Res* **111**, 132-47.
- Rima, B. K., Earle, J. A., Baczko, K., Rota, P. A. & Bellini, W. J. (1995a). Measles virus strain variations. *Curr Top Microbiol Immunol* **191**, 65-83.
- Rima, B. K., Earle, J. A., Yeo, R. P., Herlihy, L., Baczko, K., ter Meulen, V., Carabana, J., Caballero, M., Celma, M. L. & Fernandez-Munoz, R. (1995b). Temporal and geographical distribution of measles virus genotypes. *J Gen Virol* **76 (Pt 5)**, 1173-80.
- Rima, B. K., Martin, S. J. & Gould, E. A. (1979). A comparison of polypeptides in measles and SSPE virus strains. *J Gen Virol* **42**, 603-8.
- Rima, R. K. & Martin, S. J. (1976). Persistent infection of tissue culture cells by RNA viruses. *Med Microbiol Immunol (Berl)* **162**, 89-119.
- Robbins, S. M., Quintrell, N. A. & Bishop, J. M. (1995). Myristoylation and differential palmitoylation of the HCK protein-tyrosine kinases govern

- their attachment to membranes and association with caveolae. *Mol Cell Biol* **15**, 3507-15.
- Robert, C., Fuhlbrigge, R. C., Kieffer, J. D., Ayehunie, S., Hynes, R. O., Cheng, G., Grabbe, S., von Andrian, U. H. & Kupper, T. S. (1999). Interaction of dendritic cells with skin endothelium: A new perspective on immunosurveillance. *J Exp Med* **189**, 627-36.
- Runkler, N., Lehmann, C., Schneider-Schaulies, S., Klenk, H.-D. & Maisner, A. (2006). Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiol* **in press**.
- Salamero, J., Bausinger, H., Mommaas, A. M., Lipsker, D., Proamer, F., Cazenave, J. P., Goud, B., de la Salle, H. & Hanau, D. (2001). CD1a Molecules Traffic Through the Early Recycling Endosomal Pathway in Human Langerhans Cells. *J Invest Dermatol* **116**, 401-408.
- Sallusto, F. & Lanzavecchia, A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J Exp Med* **179**, 1109-18.
- Samady, L., Costigliola, E., MacCormac, L., McGrath, Y., Cleverley, S., Lilley, C. E., Smith, J., Latchman, D. S., Chain, B. & Coffin, R. S. (2003). Deletion of the virion host shutoff protein (vhs) from herpes simplex virus (HSV) relieves the viral block to dendritic cell activation: potential of vhs-HSV vectors for dendritic cell-mediated immunotherapy. *J Virol* **77**, 3768-76.
- Samuel, O. & Shai, Y. (2001). Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry* **40**, 1340-9.
- Sato, T. A., Kohama, T. & Sugiura, A. (1988). Intracellular processing of measles virus fusion protein. *Arch Virol* **98**, 39-50.
- Schmitt, A. P., Leser, G. P., Morita, E., Sundquist, W. I. & Lamb, R. A. (2005). Evidence for a new viral late-domain core sequence, FPIV, necessary for budding of a paramyxovirus. *J Virol* **79**, 2988-97.
- Schmitt, A. P., Leser, G. P., Waning, D. L. & Lamb, R. A. (2002). Requirements for budding of paramyxovirus simian virus 5 virus-like particles. *J Virol* **76**, 3952-64.
- Schneider-Schaulies, J., Meulen, V. & Schneider-Schaulies, S. (2003a). Measles infection of the central nervous system. *J Neurovirol* **9**, 247-52.
- Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J. J., Brinckmann, U., Dunster, L. M., Baczko, K., Liebert, U. G., Schneider-Schaulies, S. & ter Meulen, V. (1995a). Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**, 3943-7.
- Schneider-Schaulies, S., Klagge, I. M. & ter Meulen, V. (2003b). Dendritic cells and measles virus infection. *Curr Top Microbiol Immunol* **276**, 77-101.
- Schneider-Schaulies, S., Kreth, H. W., Hofmann, G., Billeter, M. & Ter Meulen, V. (1991). Expression of measles virus RNA in peripheral blood mononuclear cells of patients with measles, SSPE, and autoimmune diseases. *Virology* **182**, 703-11.

- Schneider-Schaulies, S. & Liebert, U. G. (1991). Pathogenetic aspects of persistent measles virus infections in brain tissue. *Sem Neurosci* **3**, 149-155.
- Schneider-Schaulies, S., Liebert, U. G., Baczko, K., Cattaneo, R., Billeter, M. & ter Meulen, V. (1989). Restriction of measles virus gene expression in acute and subacute encephalitis of Lewis rats. *Virology* **171**, 525-34.
- Schneider-Schaulies, S., Schneider-Schaulies, J., Dunster, L. M. & ter Meulen, V. (1995b). Measles virus gene expression in neural cells. *Curr Top Microbiol Immunol* **191**, 101-16.
- Schnorr, J. J., Xanthakos, S., Keikavoussi, P., Kampgen, E., ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, S. (1997). Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**, 5326-31.
- Servet-Delprat, C., Vidalain, P. O., Bausinger, H., Manie, S., Le Deist, F., Azocar, O., Hanau, D., Fischer, A. & Rabourdin-Combe, C. (2000). Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells. *J Immunol* **164**, 1753-60.
- Shaffer, J. A., Bellini, W. J. & Rota, P. A. (2003). The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology* **315**, 389-97.
- Shehu-Xhilaga, M., Ablan, S., Demirov, D. G., Chen, C., Montelaro, R. C. & Freed, E. O. (2004). Late domain-dependent inhibition of equine infectious anemia virus budding. *J Virol* **78**, 724-32.
- Shenoy-Scaria, A. M., Dietzen, D. J., Kwong, J., Link, D. C. & Lublin, D. M. (1994). Cysteine3 of Src family protein tyrosine kinase determines palmitoylation and localization in caveolae. *J Cell Biol* **126**, 353-63.
- Spaerman, C. (1908). The method of right and wrong cases. *British Journal of Psychology*.
- Spidel, J. L., Craven, R. C., Wilson, C. B., Patnaik, A., Wang, H., Mansky, L. M. & Wills, J. W. (2004). Lysines close to the Rous sarcoma virus late domain critical for budding. *J Virol* **78**, 10606-16.
- Spielhofer, P., Bachi, T., Fehr, T., Christiansen, G., Cattaneo, R., Kaelin, K., Billeter, M. A. & Naim, H. Y. (1998). Chimeric measles viruses with a foreign envelope. *J Virol* **72**, 2150-9.
- Stern, L. B., Greenberg, M., Gershoni, J. M. & Rozenblatt, S. (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**, 1661-8.
- Strack, B., Calistri, A., Accola, M. A., Palu, G. & Gottlinger, H. G. (2000). A role for ubiquitin ligase recruitment in retrovirus release. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**, 13063-8.
- Strack, B., Calistri, A., Craig, S., Popova, E. & Gottlinger, H. G. (2003). AIP1/ALIX is a binding partner for HIV-1 p6 and EIAV p9 functioning in virus budding. *Cell* **114**, 689-99.
- Strecker, T., Eichler, R., Meulen, J., Weissenhorn, W., Dieter Klenk, H., Garten, W. & Lenz, O. (2003). Lassa virus Z protein is a matrix protein and sufficient for the release of virus-like particles [corrected]. *J Virol* **77**, 10700-5.

- Suryanarayana, K., Baczko, K., ter Meulen, V. & Wagner, R. R. (1994). Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol* **68**, 1532-43.
- Tahara, M., Takeda, M. & Yanagi, Y. (2005). Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses. *J Virol* **79**, 15218-25.
- Takasu, T., Mgone, J. M., Mgone, C. S., Miki, K., Komase, K., Namae, H., Saito, Y., Kokubun, Y., Nishimura, T., Kawanishi, R., Mizutani, T., Markus, T. J., Kono, J., Asuo, P. G. & Alpers, M. P. (2003). A continuing high incidence of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) in the Eastern Highlands of Papua New Guinea. *Epidemiol Infect* **131**, 887-98.
- Takeuchi, K., Kadota, S. I., Takeda, M., Miyajima, N. & Nagata, K. (2003). Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation. *FEBS Lett* **545**, 177-82.
- Takeuchi, O., Kaufmann, A., Grote, K., Kawai, T., Hoshino, K., Morr, M., Muhlradt, P. F. & Akira, S. (2000). Cutting edge: preferentially the R-stereoisomer of the mycoplasmal lipopeptide macrophage-activating lipopeptide-2 activates immune cells through a toll-like receptor 2- and MyD88-dependent signaling pathway. *J Immunol* **164**, 554-7.
- Takimoto, T., Murti, K. G., Bousse, T., Scroggs, R. A. & Portner, A. (2001). Role of matrix and fusion proteins in budding of Sendai virus. *J Virol* **75**, 11384-91.
- Takimoto, T. & Portner, A. (2004). Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res* **106**, 133-45.
- Tatsuo, H., Ono, N., Tanaka, K. & Yanagi, Y. (2000). SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406**, 893-7.
- Thery, C., Boussac, M., Veron, P., Ricciardi-Castagnoli, P., Raposo, G., Garin, J. & Amigorena, S. (2001). Proteomic Analysis of Dendritic Cell-derived Exosomes: A Secreted Subcellular Compartment Distinct from Apoptotic Vesicles. *J Immunol* **166**, 7309-7318.
- Timmins, J., Ruigrok, R. W. & Weissenhorn, W. (2004). Structural studies on the Ebola virus matrix protein VP40 indicate that matrix proteins of enveloped RNA viruses are analogues but not homologues. *FEMS Microbiol Lett* **233**, 179-86.
- Timmins, J., Schoehn, G., Ricard-Blum, S., Scianimanico, S., Vernet, T., Ruigrok, R. W. & Weissenhorn, W. (2003). Ebola virus matrix protein VP40 interaction with human cellular factors Tsg101 and Nedd4. *J Mol Biol* **326**, 493-502.
- Tober, C., Seufert, M., Schneider, H., Billeter, M. A., Johnston, I. C., Niewiesk, S., ter Meulen, V. & Schneider-Schaulies, S. (1998). Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol* **72**, 8124-32.
- Valsamakis, A., Schneider, H., Auwaerter, P. G., Kaneshima, H., Billeter, M. A. & Griffin, D. E. (1998). Recombinant measles viruses with mutations in the C, V, or F gene have altered growth phenotypes in vivo. *J Virol* **72**, 7754-61.

- Vincent, S., Gerlier, D. & Manie, S. N. (2000). Measles virus assembly within membrane rafts. *J Virol* **74**, 9911-5.
- Vincent, S., Spehner, D., Manie, S., Delorme, R., Drillien, R. & Gerlier, D. (1999). Inefficient measles virus budding in murine L.CD46 fibroblasts. *Virology* **265**, 185-95.
- von Pirquet, C. (1908). Das Verhalten der kutanen Tuberkulin-Reaktion während der Masern. *Deutsche Medizinische Wochenschau* **34**, 1297-1300.
- WHO (2006). Weekly Epidemiological record. **81**.
- Wild, T. F., Fayolle, J., Beauverger, P. & Buckland, R. (1994). Measles virus fusion: role of the cysteine-rich region of the fusion glycoprotein. *J Virol* **68**, 7546-8.
- Wild, T. F., Malvoisin, E. & Buckland, R. (1991). Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol* **72 ( Pt 2)**, 439-42.
- Yurchak, L. K. & Sefton, B. M. (1995). Palmitoylation of either Cys-3 or Cys-5 is required for the biological activity of the Lck tyrosine protein kinase. *Mol Cell Biol* **15**, 6914-22.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
AET	2-Aminoethylisothiuroniumbromid
ATV	<i>Adjusted Trypsin Versene</i>
BSA	bovines Serumalbumin
CIIVs	<i>class II containing vesicles</i> , Klasse-II-haltige Vesikel
CPE	<i>cytopathic effect</i> , zytopathischer Effekt
Da	Dalton
DALIS	<i>DC aggresome-like induced structures</i> , DC-Aggresom- ähnlichen-induzierten Strukturen
DC(s)	dendritische Zelle(n)
DC-SIGN	<i>dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM-3) grabbing non-integrin</i> , CD209
DNA	<i>desoxyribonucleic acid</i> , Desoxyribonukleinsäure
DOC	Natrium-Deoxycholat
DRM	Detergenz-resistente Membranmikrodomänen
E	Glutaminsäure
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ED	Edmonston
ER	endoplasmatisches Retikulum
ESCRT	<i>endosomal complex required for transport</i> , Protein-Komplex, der an der Sortierung von Proteinen für den endosomalen Transport beteiligt ist
F	Phenylalanin
FACS	<i>fluorescence-activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
FIP	fusionsinhibitorisches Peptid
FKS	fötales Kälberserum
F-Protein	Fusionsprotein
h	Stunde(n)
H-Protein	Hämagglutinin-Protein
I	Isoleucin

---

k	Kilo-
K	Lysin
l	Liter
L	Leucin
L-Protein	<i>large-</i> Protein
M	molar
m	milli-
MHC	<i>major histocompatibility complex</i> , Haupthistokompatibilitätskomplex
MIBE	<i>measles inclusion body encephalitis</i> , Einschlusskörperchen- Enzephalitis
min	Minute(n)
MOI	<i>multiplicity of infection</i>
M-Protein	Matrix-Protein
MV	Masernvirus
MVB	<i>multivesicular body</i> , multivesikuläres Körperchen
NEM	N-Ethylmaleimide
NK	Negativkontrolle
N-Protein	Nukleokapsidprotein
OD	optische Dichte
P	Prolin
PBMC	<i>peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	<i>phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Saline
PIE	postinfektiöse Enzephalitis
P-Protein	Phosphoprotein
Q	Glutamin
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde(n)
S	Serin
SDS	Natrium ( <i>Sodium</i> )-Dodecylsulfat

SLAM	<i>signaling lymphocyte activation molecule</i> , CD150
SSPE	subakute sklerotisierende Panzephelitis
T	Threonin
TCID <sub>50</sub>	<i>tissue culture infectious dose 50</i> , Kultur-infektiöse Dosis 50
ü. N.	über Nacht
V	Valin
VLP	<i>Virus-like particle</i> , Virus-ähnliches Partikel
Vps	<i>vacuolar protein sorting</i> , Vakuoläre Proteinsortierung
VSV	<i>vesicular stomatitis virus</i> , Virus der vesikulären Stomatitis
WTF	Wildtyp Fleckenstein
X	eine beliebige Aminosäure
Y	Tyrosin



## 10 Veröffentlichungen

### 10.1 Publikationen

**Pohl Lehmann, C.**, Shishkova, J., Schneider-Schaulies, S. (2006). Viruses and dendritic cells: enemy mine. *Cell. Microbiol.*, in Druck.

Runkler, N., **Lehmann, C.**, Schneider-Schaulies S., Klenk, H.-D., Maisner, A. (2006). Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell. Microbiol.*, in Druck.

**Pohl Lehmann, C.**, Duprex, W. P., Krohne, G., Rima, B. K., Schneider-Schaulies, S. (2006). Measles virus M and F proteins associate with detergent resistant membrane fractions and separately promote formation of virus-like particles. *J. Gen. Virol.*, in Revision.

### 10.2 Vorträge

Klagge, I. M., Abt, M., Fries, B, **Pohl, C.**, Schneider-Schaulies, S. (2004). Impact of Measles Virus Dendritic Cell Infection of T Cell Polarisation *in vitro*. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Tübingen, 17.-20. März 2004

**Lehmann, C.** und Schneider-Schaulies, S. (2005). Studies on the subcellular distribution of measles virus matrix protein. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Hannover, 16.-19. März 2005

**Lehmann, C.** und Schneider-Schaulies, S. (2005). Studies on the subcellular distribution of measles virus matrix protein. Society for General Microbiology, Edinburgh, 4.-7. April 2005

**Lehmann, C.**, Salditt, A., Duprex, W. P., Rima, B. K., Schneider-Schaulies, S. (2006). Cell type specific trafficking of measles virus matrix protein. Society for General Microbiology, Warwick, 3.-6. April 2006

### 10.3 Posterpräsentationen

Klagge, I. M., Klett, M., Fries, B., **Pohl, C.**, Lien, E., Kirschning, C. J., Duprex, W. P., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, S. (2003). The role of Measles virus glycoprotein complex in regulating antigen-presenting cell differentiation and function. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Berlin, 26.-29. März 2003

**Lehmann, C.** und Schneider-Schaulies, S. (2004). Studies on Subcellular Distribution of Measles Virus Matrix Protein. Arbeitskreis Zellbiologie der Gesellschaft für Virologie, Zeilitzheim, 13.-15. September 2004

Runkler, N., **Lehmann, C.**, Maisner, A. (2006). Measles virus M protein stability and accumulation is a prerequisite for M-RNP transport to the cell surface. Meeting Negative Strand Viruses, Salamanca, 17.- 22. Juni 2006

## 11 Lebenslauf

Name **Christine Lehmann geb. Pohl**

Geburtsdaten 6. August 1978  
in Münster/Westfalen

### Ausbildung

1997 **Allgemeine Hochschulreife**,  
Integrierte Gesamtschule Mühlenberg, Hannover

1997-2001 **Biologiestudium (Diplom)**,  
Universität Hannover

1999 **Vordiplom**

2002 **Diplomarbeit**  
am Institut für Virologie der  
Tierärztlichen Hochschule Hannover  
Thema der Diplomarbeit:  
„Die Bedeutung des Matrix-Proteins des Virus der vesikulären  
Stomatitis für die Freisetzung aus polarisierten Epithelzellen“  
Abschluss als Diplom-Biologin

2003 **Doktorarbeit**  
am Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-  
Universität, Würzburg  
Thema der Dissertation:  
„Die Bedeutung des Masernvirus Matrix-Proteins für die  
Virusfreisetzung und zelltypabhängige Unterschiede seines  
intrazellulären Transports“

Würzburg, im November 2006

---

## **Der Dank gebührt...**

...Frau Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies für die Überlassung des interessanten Forschungsthemas, ihre stete Diskussionsbereitschaft und die gute Betreuung.

...Herrn Prof. Dr. Manfred Scharl für die freundliche Übernahme des Koreferats.

...Herrn Prof. Dr. Bert Rima, Herrn Dr. Paul Duprex und ihren Mitarbeitern von der Queen's University Belfast, Nordirland, für die angenehme Zusammenarbeit und ihre Gastfreundschaft.

...Herrn Prof. Dr. Georg Krohne und seinen Mitarbeitern für die Einführung in das Arbeiten am Elektronenmikroskop und ihren guten Rat.

...Herrn Dr. Andreas Opitz für seine Hilfe bei den Leukapheresen.

...allen meinen Kollegen im Labor, die stets mit Rat und Tat zur Stelle waren.

...meiner Familie und meinen Freunden, die mich immer unterstützt und ermuntert haben, besonders Marion und Dagmar und meinem Vater für ihre Geduld und Hilfe bei den Korrekturen.