

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg
Lehrstuhl für Virologie
Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

Interaktion
von Masernviren mit vaskulären Endothelzellen

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von
Oliver Andres
aus Obernburg am Main

Würzburg, Dezember 2006

Referent: Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Schneider-Schaulies
Koreferent: Prof. Dr. med. Peter Friedl, PhD
Dekan: Prof. Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 20. Dezember 2007

Der Promovend ist Arzt.

*„Was ist das Schwerste von Allem? Was Dir das Leichteste dünkt:
Mit den Augen zu sehen, was vor den Augen Dir liegt.“*

Johann Wolfgang von Goethe

Meinen Eltern in Dankbarkeit
Für Kerstin und Anna

Inhalt

Inhalt		iv
1	Einleitung	1
1.1	Masern	1
1.1.1	Historische und epidemiologische Übersicht	1
1.1.2	Klassische akute Masern	3
1.1.3	Komplikationen und Folgeerkrankungen	4
1.2	Das Masernvirus	7
1.2.1	Taxonomische Einordnung und Aufbau des Masernviruspartikels	7
1.2.2	Zelluläre Rezeptoren für Masernviren	9
1.2.3	Pathophysiologie und Pathogenese der Masernvirusinfektion	12
1.3	Das vaskuläre Endothel	14
1.3.1	Strukturelle und topologische Klassifizierung von Epithelien	14
1.3.2	Morphologie und Funktion des Gefäßendothels	15
1.4	Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit	17
2	Material	18
2.1	Zellen	18
2.2	Virusstämme	19
2.3	Antikörper und Antikörperseren	20
2.4	Lektindetektion und Kernfärbung	24
2.5	Enzyme	24
2.6	Zytokine, Mediatoren, Hormone und Endotoxine	25

Inhalt

2.7	Nukleotide	25
2.8	Nährmedien und Seren	26
2.9	Lösungen und Puffer	28
2.10	Chemikalien und Antibiotika	30
2.11	Kits	34
2.12	Ein- und Mehrwegmaterialien	35
2.13	Apparaturen und Geräte	38
3	Methoden	41
3.1	Zellbiologische Methoden	41
3.1.1	Gewinnung von Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene	41
3.1.2	Kultur und Konservierung von Zellen	44
3.2	Histo- und zytochemische Methoden	49
3.2.1	Herstellung der Eindecklösung	49
3.2.2	Durchflusszytometrie	50
3.2.3	Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie	52
3.3	Virologische Methoden	53
3.3.1	Amplifikation attenuierter Masernvirusstämme	53
3.3.2	Amplifikation virulenter Masernvirusstämme	53
3.3.3	Virustiterbestimmung mittels Plaquetitration	54
3.3.4	Virustiterbestimmung mittels Endpunkttitration	55
3.3.5	Virusbindungsassay	56
3.3.6	Infektions- und Infektionsinhibitionsassay	56
3.3.7	Quantifizierung der Masernvirusreplikation	57
3.3.8	Inaktivierung von Masernviren	58
3.4	Proteinbiochemische Methoden	58
3.4.1	Bestimmung von Proteinkonzentrationen	58
3.4.2	Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern	59
3.4.3	Direktmarkierung eines monoklonalen Antikörpers	59

Inhalt

3.4.4	Herstellung von Zellysaten	60
3.4.5	Gelelektrophorese von Proteinen	60
3.4.6	Western-Blot-Analyse	62
3.5	Molekularbiologische Methoden	63
3.5.1	Isolation von Ribonukleinsäuren	63
3.5.2	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	64
3.5.3	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren	64
3.5.4	Reverse Transkription	65
3.5.5	Polymerase-Kettenreaktion	66
4	Ergebnisse	67
4.1	Charakterisierung der Endothelzellen	67
4.1.1	Voruntersuchungen zur Kultur von Endothelzellen	67
4.1.2	Morphologie der Endothelzellen	67
4.1.3	Expression von Endothelzellmarkern und Adhäsionsmolekülen	70
4.2	Expression von Masernvirusrezeptoren durch Endothelzellen	80
4.2.1	Transkription von Masernvirusrezeptoren	80
4.2.2	Expression von Masernvirusrezeptorproteinen	84
4.3	Bindung von Masernviren an Endothelzellen	91
4.4	Infektion von Endothelzellen mit Masernviren	96
4.4.1	Mikroskopische Darstellung der Masernvirusinfektion	96
4.4.2	Durchflusszytometrische Auswertung der Masernvirusinfektion	110
4.4.3	Replikation und Amplifikation von Masernviren	117
4.5	Rezeptorbenutzung und Modulation der Rezeptorexpression durch Masernviren	118
5	Diskussion	123
5.1	Bedeutung von Gefäßendothelzellen in der Pathogenese einer Masernvirusinfektion	123

Inhalt

5.2	Auswahl des Zellkulturmodells und Charakterisierung der verwendeten vaskulären Endothelzellen	124
5.3	Systematische Analyse der Masernvirusrezeptorexpression durch Gefäßendothelzellen	127
5.4	Wechselwirkung zwischen Masernviren und vaskulären Endothelzellen	128
5.5	Pathogenetische Überlegungen und Ausblick	130
	Zusammenfassung	133
	Abkürzungen	135
	Abbildungen und Tabellen	142
	Literatur	145
	Danksagung	viii
	Curriculum vitae	x

1 Einleitung

1.1 Masern

1.1.1 Historische und epidemiologische Übersicht

Dem persischen Arzt und Gelehrten Al-Razi, in der abendländischen Literatur unter dem Namen Rhazes bekannt, wird die Erstbeschreibung der Masern um etwa 900 n. Chr. zuerkannt (Griffin 2001, Katz 1995, Weissbrich *et al.* 2003). Es wird angenommen, dass er in einer seiner Schriften die Pocken von den Masern deskriptiv und klinisch unterscheiden konnte (Griffin 2001).

Masern werden heute als eine relativ neue Krankheit des Menschen angesehen. Es wird vermutet, dass sie durch enges Zusammenleben von Mensch und Rind in dicht bevölkerten Gebieten des vorderen und mittleren Orients in der Zeit der ersten Hochkulturen entstanden und im 8. Jahrhundert n. Chr. über die Sarazeneninvasion nach Mitteleuropa gelangt sind (Griffin 2001, McNeill 1976, Norrby *et al.* 1992, Rolleston 1937). Es dauerte allerdings noch etwa ein Jahrtausend, bis Anderson und Goldberger Masern 1911 als eine virale Erkrankung identifizieren konnten (Anderson & Goldberger 1911), und erst nach der erfolgreichen Isolierung und Propagierung des Masernvirus 1954 durch Enders und Peebles (Enders & Peebles 1954) war es möglich, auch einen Impfstoff zur Infektionsprophylaxe zu entwickeln. Bis zur Einführung der Masernvakzine galten Masern als klassische Kinderkrankheit, waren doch 95–98 % der Kinder bis zum Alter von 18 Jahren mit dem Masernvirus infiziert (Langmuir 1962, Langmuir *et al.* 1962, Snyder *et al.* 1962). In den Vereinigten Staaten von Amerika sank die Zahl der berichteten Masernfälle nach Einführung des Masernimpfstoffs von 894.134 im Jahr 1941 um mehr als 99,7 % auf 138 im Jahr 1997 (Maldonado 2001).

Masern gehören immer noch zu einer der gefährlichsten Infektionskrankheiten des Menschen. Weltweit verstarben im Jahr 2001 etwa 750.000 Menschen, meist Kinder, an Masern. Damit gehören sie zu einer der führenden Todesursachen im Kindesalter weltweit (WHO 2002). Die Weltgesundheitsorganisation WHO und das Weltkinderhilfswerk der Vereinten Nationen UNICEF verfolgen nach der erfolgreichen, globalen Eradikation der Pocken das Ziel, auch Masern weltweit zu eliminieren. Der strategische Plan von 2001 sah vor, die mit Masern verbundenen Todesfälle bis 2005 durch konsequente Impfkampagnen zu halbieren und Masern in Amerika bis 2000, in Europa bis 2007 und im östlichen Mittelmeer bis 2010 zu eradizieren (WHO 2001). Seit 1996 sind zwar in Finnland keine autochthonen Masernerkrankungen mehr aufgetreten (Rose 2003), jedoch selbst in Ländern mit hohem medizinischem Standard erleiden diese Pläne und Bemühungen immer wieder Rückschläge. Die Masernepidemien in der ersten Hälfte des Jahres 2000 im Osten Irlands, Ende 2001 bis Mitte 2002 im Raum Coburg, Anfang bis Mitte des Jahres 2002 in Süditalien und in der ersten Hälfte des Jahres 2005 in Hessen sind beispielhaft für einen insuffizienten Durchimpfungsgrad sogar in industrialisierten Ländern (Robert-Koch-Institut 2000a/b, 2002a–c, 2003, 2005a–c). Und auch in diesem Jahr war in einer angesehenen deutschen Tageszeitung zu lesen: „Masern breiten sich in Nordrhein-Westfalen aus“ (Frankfurter Allgemeine Zeitung, 11.05.2006).

Aktuelle epidemiologische Daten für Masern in Deutschland liegen aus den Jahren 2004 und 2005 vor (Robert-Koch-Institut 2006). Bundesweit wurden im vergangenen Jahr 2005 778 Masernerkrankungen gemeldet. Die Inzidenz belief sich auf 0,9 pro 100.000 Einwohner, wobei die altersspezifische Inzidenz bei den Einjährigen am höchsten lag. Bei zweien der erkrankten Kinder wurde eine Masernenzephalitis, bei 17 eine Pneumonie und bei elf eine Otitis media diagnostiziert, ein 14jähriges Mädchen verstarb an den Folgen einer Masernvirusinfektion. Bei 96 % der an Masern Erkrankten lagen Informationen zum Impfstatus vor, 89 % davon waren nicht geimpft. Erhebungen zum Durchimpfungsgrad aus dem Jahr 2004 belegen, dass nur 93 % der gerade eingeschul-ten Kinder mindestens einmal und nur 66 % auch ein zweites Mal gegen Masern geimpft worden waren.

1.1.2 Klassische akute Masern

Masern sind eine hochkontagiöse Erkrankung, deren infektiöses Agens das Masernvirus ist. Die Übertragung erfolgt aerogen als Tröpfcheninfektion über den Respirationstrakt oder gar über die Bindehaut meist schon während des Prodromalstadiums, das nach einer Inkubationszeit von 10–12 Tagen ohne klinische Zeichen einer Infektion mit uncharakteristischen katarrhalischen Symptomen wie Rhinitis, Halsschmerzen, Heiserkeit, Müdigkeit und Appetitlosigkeit beginnt. Nach 1–2 Tagen nehmen diese unspezifischen Beschwerden zu und werden von Fieber, trockenem oder bellendem Husten und einer Keratokonjunktivitis begleitet, die zu einer ausgesprochenen Lichtscheu führt. Feinkörnige, leicht erhabene, gräulich-weiße Effloreszenzen mit rötlichem Hof an der Wangenschleimhaut, die nach weiteren 2–3 Tagen in Verbindung mit einem fleckigen, dunkelroten Exanthem erscheinen, werden als Kopliksche Flecken bezeichnet und als pathognomonisch für eine Infektion mit dem Masernvirus angesehen (Griffin 2001, Katz 1995, Maldonado 2001, Schuster & Kreth 2001).

Nach einem leichten Fieberabfall geht das Prodromalstadium unter abruptem Fieberanstieg in das Exanthemstadium über. Das zunächst feinfleckige Exanthem beginnt hinter den Ohren oder an der Stirn und breitet sich makulopapulös innerhalb eines Tages zentrifugal über den Stamm bis auf die Oberschenkel aus und erreicht nach 2–3 Tagen die Füße. Die Schwere der Erkrankung korreliert mit der Ausprägung des Ausschlags, der nur den Stamm erreichen oder sich konfluent über das ganze Integument erstrecken kann. Nicht selten zeigt sich eine milde, hämorrhagische Komponente mit Ekchymosen oder Petechien. Meist besteht zudem eine generalisierte Lymphadenopathie, bisweilen eine milde Splenomegalie. Bei der Hälfte der akut an Masern Erkrankten sind pathologische, elektroenzephalographische Veränderungen nachzuweisen, die in der Regel temporärer Natur sind. Der unkomplizierte Verlauf ist durch rasche Entfieberung und das Abblassen des Exanthems unter bräunlicher Verfärbung vier Tage nach seinem Beginn in Ausbreitungsrichtung gekennzeichnet. Während die übrigen Symptome rückläufig sind, besteht der Husten etwa eine Woche und die allgemeine Mattigkeit einige Wochen fort. Es wird eine effiziente und protektive Immunantwort ausgelöst, die eine lebens-

lange Immunität nach sich zieht (Griffin 2001, Katz 1995, Maldonado 2001, Panum 1938, Schuster & Kreth 2001).

Die Diagnose kann wegen der charakteristischen Symptome im Rahmen einer Epidemie meist klinisch gestellt werden. Eine Leukopenie mit Erniedrigung der Granulowie auch der Lymphozytenzahlen ist ein typischer hämatologischer Laborbefund. Bei Einzelerkrankungen sollte die Diagnose serologisch gesichert werden. Ein Virusdirektnachweis oder eine Virusisolierung ist nur in Ausnahmefällen nötig. Häufig wird bei Erwachsenen eine hepatische Beteiligung mit Oberbauchschmerzen und einer leichten Erhöhung der Glutamat-Oxalacetat-Transaminase, ggf. verbunden mit einer Hyperbilirubinämie, beobachtet (Maldonado 2001, Schuster & Kreth 2001).

Die Therapie ist symptomatisch, eine spezifische antivirale Therapie gibt es nicht. Eine Therapie mit Vitamin A kann eine schwere Maserninfektion bei hospitalisierten oder unterernährten Kindern positiv beeinflussen (Maldonado 2001).

1.1.3 Komplikationen und Folgeerkrankungen

Komplikationen einer Infektion mit dem Masernvirus betreffen eine Reihe von Organ-systemen. Die masernvirusinduzierte Immunsuppression kann für Monate anhalten und somit opportunistische Infektionen begünstigen oder gar latente virale oder bakterielle Infektionen reaktivieren.

Im Respirationstrakt stehen die Otitis media und Bronchopneumonien im Vordergrund, die meist durch Pneumokokken, Streptokokken der Gruppe A, *Staphylococcus aureus* oder *Haemophilus influenzae* Typ b verursacht werden. Bronchiolitiden oder Laryngotracheobronchitiden werden nur noch selten beobachtet. Bei immunsupprimierten Patienten kann die Riesenzellpneumonie einen fatalen Verlauf nehmen. Elektrokardiographische Veränderungen können Ausdruck einer transienten myo- oder perikardischen Komponente oder atrioventrikulärer Überleitungsstörungen sein, sind aber meist nicht von klinischer Relevanz. Nicht ungewöhnlich hingegen sind gastrointestinale Beschwerden und Diarrhoen, die eine massive Dehydratation bewirken und vor allem in Entwicklungsländern große Probleme bereiten können. Hämostaseologische Störungen können sich sowohl als disseminierte intravasale Gerinnung mit Gangränbildung oder

Verbrauchskoagulopathie im akuten Stadium als auch als thrombozytopenische Purpura erst einige Wochen nach einer Masernvirusinfektion äußern. Als Sonderform gelten die hämorrhagischen Masern oder *black measles*, die mit einem plötzlichen Fieberanstieg, einem konfluenten, hämorrhagischen Exanthem und Schleimhautblutungen aus Mund, Nase oder Magen-Darm-Trakt einhergehen und auf eine Dysregulation der intravasalen Gerinnung oder auf eine vaskuläre Schädigung zurückzuführen sind. Zeichen einer Enzephalitis oder Pneumonie kommen hinzu (Griffin 2001, Katz 1995, Maldonado 2001, Schuster & Kreth 2001, Weissbrich *et al.* 2003).

Besonders gefürchtet sind neurologische Komplikationen und Folgeerkrankungen. Häufig sind schon bei einer unkomplizierten Masernvirusinfektion elektroenzephalographische Abnormalitäten und pleozytische Liquorveränderungen nachweisbar.

Die akute postinfektiöse Masernenzephalomyelitis ist die häufigste neurologische Komplikation, ihre Inzidenz liegt unter den an Masern Erkrankten bei 1–2:1.000. Sie beginnt im Mittel zwischen dem 3. und 9. Tag nach Auftreten des Exanthems, kann aber auch schon während der Prodromalphase der Masern oder bis zu einige Wochen nach Krankheitsbeginn mit Fieber, Kopfschmerzen, Vigilanzstörungen, zerebralen Anfällen, fokal-neurologischen Auffälligkeiten oder zentralen Koordinationsstörungen klinisch symptomatisch werden (Katz 1995, Maldonado 2001). Ätiologisch wird eine autoimmunologisch vermittelte Reaktion favorisiert, die gegen das basische Myelinprotein gerichtet ist, eine Demyelinisierung nach sich zieht und auf einem molekularen Mimikry beruhen kann (Griffin 2001, Weissbrich *et al.* 2003). Nur selten existieren Berichte, dass Masernviren aus Liquor oder Hirngewebe erkrankter Patienten propagiert werden konnten (McLean *et al.* 1966, ter Meulen *et al.* 1972). Im Liquor lässt sich häufig eine milde lymphozytäre Pleozytose nachweisen, eine Eiweißerhöhung ist nicht obligat. Für die Diagnosestellung ist der klinische und zeitliche Zusammenhang mit einer Masernvirusinfektion entscheidend (Weissbrich *et al.* 2003). Die akute postinfektiöse Masernenzephalomyelitis gilt als eine ernste und gefährliche Komplikation. Sie ist mit einer Letalität von 30 % und einer Defektheilungsrate von etwa 20 % behaftet, die Verhaltensauffälligkeiten, mentale Einschränkungen, zerebrale Anfälle oder Taubheit beinhalten kann (Schuster & Kreth 2001, Weissbrich *et al.* 2003).

Die *measles inclusion body encephalitis* ist eine besondere Enzephalitisform, die auf einer direkten Invasion des zentralen Nervensystems mit dem Masernvirus beruht. Sie manifestiert sich klinisch nach einer Latenz von wenigen Wochen bis zu sechs Monaten bei Patienten unter massiver Immunsuppression und führt in der Regel rasch zum Tod (Katz 1995, Schuster & Kreth 2001).

Die subakute sklerosierende Panenzephalitis ist eine sehr seltene, persistente und langsam progrediente Erkrankung des zentralen Nervensystems. Sie folgt einer Masernvirusinfektion mit einer Latenz von 6–8 Jahren, die Streuung von 2–30 Jahren allerdings ist groß. Das Erkrankungsalter liegt damit durchschnittlich zwischen 9 und 13 Jahren, selbst junge Erwachsene können betroffen sein. Seit der Einführung der Masernimpfung ist die Inzidenz der SSPE deutlich gesunken. Sie wurde in einer ungeimpften Population oder unter an Masern Erkrankten bisher mit 1:100.000 bis 1:500.000 angegeben, neuere epidemiologische Berechnungen offenbaren eine vielfach höhere Inzidenz von deutlich über 1:5.000 (Bellini *et al.* 2005, Campbell *et al.* 2005, Maldonado 2001, Schuster & Kreth 2001, Weissbrich *et al.* 2003).

Der klinische Verlauf weist eine hohe Variabilität auf. Die Erkrankung manifestiert sich in Stadium I mit einem generalisierten Nachlassen der intellektuellen Leistungen. Chorioretinitische Veränderungen des Augenhintergrunds als Folge einer zentralnervösen Masernvirusinfektion können zu diesem Zeitpunkt mitunter beobachtet werden. Der Übergang in das Stadium II ist nach Wochen oder Monaten durch das Auftreten neurologischer Symptome gekennzeichnet. Fokale oder gar generalisierte, rhythmische Myoklonien mit einer Frequenz von etwa 5–15/min sind ein charakteristisches Symptom, das mit periodischen, hochvoltigen Komplexen langsamer Wellen im Elektroenzephalogramm, den Radermecker-Komplexen, korrespondiert. Dezerebration, Ausfälle essenzieller Hirnstammfunktionen und völliger Verlust kortikaler Aktivitäten sind Kennzeichen der Stadien III und IV. In 5 % der Fälle werden Spontanremissionen beobachtet, zwei Drittel der Patienten versterben in Stadium III etwa 3–5 Jahre nach Ausbruch der ersten Auffälligkeiten. Die Verdachtsdiagnose kann anamnestisch und klinisch gestellt werden, die endgültige Diagnosesicherung sollte neben der serologischen Untersuchung auf erhöhte masernvirusspezifische IgM- und IgG-Antikörpertiter unbedingt den Nachweis der intrathekalen Bildung masernvirusspezifischer IgG-Antikörper einschließen.

Die elektroenzephalographische Untersuchung vermag wegweisend zu sein. Eine spezifische Therapie ist bisher nicht verfügbar, nur die Masernschutzimpfung stellt eine wirksame Prävention der Erkrankung dar (Katz 1995, Maldonado 2001, Schuster & Kreth 2001, Weissbrich *et al.* 2003).

1.2 Das Masernvirus

1.2.1 Taxonomische Einordnung und Aufbau des Masernviruspartikels

Das Masernvirus ist ein umhülltes Virus mit einer nichtsegmentierten, einzelsträngigen RNA negativer Polarität. Es ist Mitglied und Namensgeber des Genus *Morbillivirus* und gehört damit der Ordnung der *Mononegavirales*, der Familie der *Paramyxoviridae* und der Unterfamilie der *Paramyxovirinae* an, die erst vor einigen Jahren zusammen mit der Unterfamilie der *Pneumovirinae* innerhalb der Familie der *Paramyxoviridae* neu gegründet wurde (International Committee on Taxonomy of Viruses 2002).

Unter dem Genus *Morbillivirus* sind weitere, phylogenetisch mit dem Masernvirus verwandte, ausschließlich tierpathogene Viren klassifiziert: das Hundestaupevirus CDV, das Delphinmorbillivirus DMV, das Seehundestaupevirus PDV, das Tümmlermorbillivirus PMV, das *Peste-des-petits-ruminants*-Virus PPRV und das Rinderpestvirus RPV. Eine besonders enge Verwandtschaft besteht zum Rinderpestvirus (McNeill 1976).

Das Masernviruspartikel ist ein pleomorphes Virion mit einer variablen Größe von 100–300 nm. Seine Hülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht und den beiden viralen Oberflächenproteinen. Das Hämagglutininprotein ist ein glykosyliertes Transmembranprotein vom Typ II und von etwa 80 kda Größe, das in der Virushülle oder an der Zelloberfläche als Homotetramer vorliegt. Es bindet an den zellulären Rezeptor und determiniert somit den Tropismus des Masernvirus. Das Fusionsprotein ist ein glykosyliertes Transmembranprotein vom Typ I und von etwa 60 kda Größe. Aus dem Vorläuferprotein F_0 werden die beiden Untereinheiten F_1 und F_2 abgespalten und bilden einen über eine Disulfidbrücke verbundenen, funktionellen Komplex. Als Homotrimer oder -tetramer ist er in Anwesenheit des H-Proteins für die Fusion der Virus- und der Wirtszellmembran

essentiell. An der Innenseite der Virushülle stabilisiert das 37 kda große Matrixprotein mindestens eines der beiden viralen Oberflächenproteine und vermittelt die Vernetzung von Hülle und Nukleokapsid. Dabei scheinen auch Aktinfilamente eine Rolle zu spielen, die von der infizierten Zelle stammen und bei der Knospung im Viruspartikel verbleiben (Griffin 2001, Horikami & Moyer 1995).

Die virale, nichtsegmentierte, einzelsträngige RNA negativer Polarität ist in einem helikalen Ribonukleoprotein eingebettet. Das 60 kda große Nukleokapsidprotein bildet mit der viralen RNA einen stabilen Komplex, schützt sie vor dem enzymatischen Abbau durch zelluläre Nukleasen und moduliert ihre Replikation. Ein weiterer Bestandteil des Ribonukleokapsidkomplexes ist das mit etwa 250 kda größte virale Protein, das Large-Protein, das zusammen mit dem 70 kda großen Phosphoprotein die viruseigene RNA-abhängige RNA-Polymerase bildet. Das C- und das V-Protein sollen die Masernvirusreplikation regulieren und für die Masernvirusvirulenz unerlässlich sein (Griffin 2001, Horikami & Moyer 1995). Das Genom umfasst innerhalb der 15.894 Nukleotide sechs Gene für die viralen Strukturproteine und eine nichttranslatierte Region von etwa 1.000 Nukleotiden. Das Phosphoprotein kodiert für das P-, das C- und das V-Protein (Griffin 2001). Abbildung 1.1 bietet eine schematische Darstellung des Masernvirus.

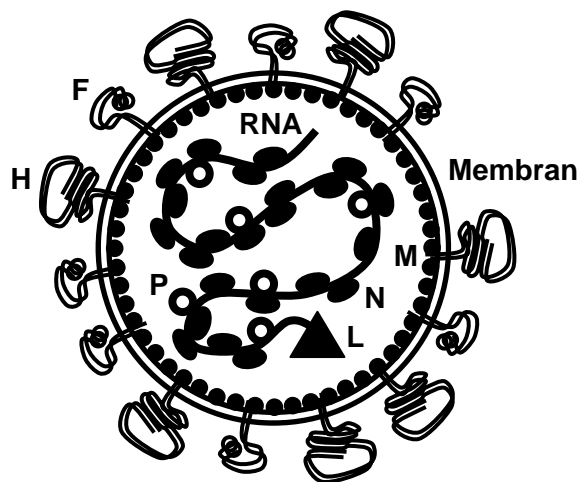


Abbildung 1.1: Schematische Darstellung des Masernviruspartikels.

Schematische Darstellung des Masernviruspartikels mit der Hüllmembran zellulären Ursprungs, der einzelsträngigen RNA negativer Polarität und den viralen Proteinen Hämagglutininprotein (H), Fusionsprotein (F), Matrixprotein (M), Nukleokapsidprotein (N), Phosphoprotein (P) und Large-Protein (L).

1.2.2 Zelluläre Rezeptoren für Masernviren

Die Adsorption des Virus an die Wirtszelle ist der erste Schritt des Infektionszyklus. Das Virus bindet dabei in der Regel spezifisch an ein zelluläres Oberflächenmolekül, das für bestimmte Aufgaben und Funktionen im Wirtsorganismus verantwortlich ist. Für das Masernvirus konnten in der Vergangenheit zwei Oberflächenmoleküle als zelluläre Rezeptoren identifiziert werden: das *membrane cofactor protein* MCP oder CD46 und das *signaling lymphocytic activation molecule* SLAM oder CD150.

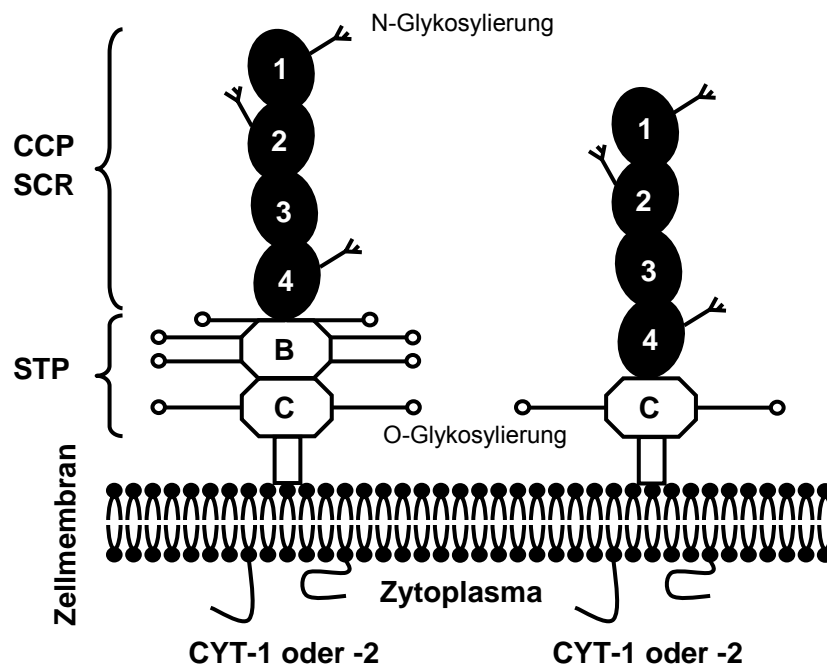


Abbildung 1.2: Schematische Darstellung der vier humanen Hauptisoformen von CD46.

Schematische Darstellung der vier humanen Hauptisoformen von CD46, die sich durch eine variable Expression der juxtamembranären, O-glykosylierten Domänen STP und der zytoplasmatischen Enden CYT-1 oder -2 unterscheiden (modifiziert nach Riley-Vargas *et al.* 2004).

CD46 gehört der Familie der Komplementrezeptoren an und ist ein fast ubiquitär exprimiertes Glykoprotein, das die autologe Komplementaktivierung reguliert und körpereigene Zellen schützt, indem es die Komplementfaktoren C3b und C4b bindet und zur Inaktivierung freigibt. Eine verminderte Expression von CD46 führt zu einer erhöhten

Empfindlichkeit und Anfälligkeit der Zellen (Horikami & Moyer 1995, Liszewski *et al.* 1991, Oglesby *et al.* 1992, Loveland *et al.* 1993, Schnorr *et al.* 1995). CD46 wird ubiquitär auf allen humanen Körperzellen mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert (Cole *et al.* 1985). Das Ausmaß seiner Expression auf der Zelloberfläche kann innerhalb des Organismus, abhängig von der Zellart, sehr stark variieren (Ogata *et al.* 1997, Seya *et al.* 1990). Beim Menschen werden durch Vererbung und alternatives Spleißen hauptsächlich vier Isoformen exprimiert (Riley-Vargas *et al.* 1994). Abbildung 1.2 bietet eine schematische Darstellung der vier wesentlichen Isoformen von humanem CD46.

CD46 wurde 1993 als zellulärer Rezeptor für attenuierte Masernvirusstämme beschrieben und bestätigt (Dörig *et al.* 1993, Naniche *et al.* 1993). Weitere Experimente zeigten daraufhin, dass für die Bindung des Hämagglutininproteins die beiden äußeren CCP- bzw. SCR-Domänen 1 und 2 ausreichen, während die Komplementbindung über die CCP- bzw. SCR-Domänen 2–4 vermittelt wird (Buchholz *et al.* 1997, Casanovas *et al.* 1999, Manchester *et al.* 1995, Manchester *et al.* 2000a). Jede der humanen Hauptisoformen von CD46 kann als Rezeptormolekül fungieren (Gerlier *et al.* 1994, Manchester *et al.* 1994, Varior-Krishnan *et al.* 1994). Virulente Masernvirusstämme und klinische Masernvirusisolate vermögen CD46 nicht oder nur in Ausnahmefällen mit sehr geringer Affinität zu binden, rein CD46-exprimierende Zellarten werden daher nicht oder nur wenig effizient infiziert (Bartz *et al.* 1998, Buckland & Wild 1997, Erlenhoefer *et al.* 2002, Hsu *et al.* 1998, Manchester *et al.* 2000b, Ono *et al.* 2001, Tanaka *et al.* 1998, Tatsuo *et al.* 2000a). Das Ausmaß der Expression von CD46 an der Oberfläche von Wirtszellen kann durch Masernviren biphasisch moduliert werden. Allein der Kontakt der Wirtszelle mit CD46-interagierenden Masernvirusstämmen oder entsprechend infizierten Zellen führt zu einer frühen, die durch die Infektion der Wirtszelle einsetzende Virusreplikation zu einer endgültigen Herabregulation von CD46 von ihrer Oberfläche (Bartz *et al.* 1998, Schneider-Schaulies *et al.* 1995a). Die Fähigkeit eines Masernvirusstamms zur Herabregulation von CD46 kann dabei auf wenige Aminosäuren in der Sequenz des Hämagglutininproteins reduziert werden (Bartz *et al.* 1996, Lecouturier *et al.* 1996, Hsu *et al.* 1998). Einem molekularen Magneten gleich dient CD46 ebenfalls als zellulärer Rezeptor für eine Reihe humanpathogener Erreger: *Streptococcus pyogenes* (Okada *et al.* 1995), *Neisseria gonorrhoeae* und *meningitidis* (Kallstrom *et al.* 1997),

Humanes Herpesvirus 6 (Santoro *et al.* 1999), viele Adenoviren der Gruppen B und D (Gaggar *et al.* 2003, Marttila *et al.* 2005, Segerman *et al.* 2003) und uropathogene *Escherichia coli* (Li *et al.* 2006).

Neben CD46 ist SLAM als ein weiterer zellulärer Rezeptor für das Masernvirus bekannt. Es ist ein immunmodulierendes Glykoprotein, das der CD2-Untergruppe der Immunglobulinsuperfamilie angehört und konstitutiv an der Zelloberfläche von unreifen Thymozyten, T-Gedächtniszellen, einem Teil der B-Lymphozyten und dendritischen Zellen, die aus Monozyten generiert wurden, exprimiert wird (Cocks *et al.* 1995, Sidorenko & Clark 1993). Das Expressionsniveau von SLAM ist bei der Untergruppe der T-Helfer-1-Zellen um ein Vielfaches höher als bei T-Helfer-2-Zellen (Hamalainen *et al.* 2000). Eine Induktion von SLAM wird bei aktivierten B- und T-Lymphozyten, dendritischen Zellen und Monozyten beobachtet (Cocks *et al.* 1995, Minagawa *et al.* 2001, Ohgimoto *et al.* 2001, Polacino *et al.* 1996, Punnonen *et al.* 1997, Sidorenko & Clark 1993). SLAM wird in vier verschiedenen Isoformen exprimiert: zwei membrangebundene Formen mit verschieden langer zytoplasmatischer Domäne sowie einer löslichen und einer zytoplasmatischen Form (Cocks *et al.* 1995). Neben der membrangebundenen Form besitzen auch lösliche Formen von SLAM stimulatorische Aktivität (Punnonen *et al.* 1997). SLAM kann mit niedriger Affinität als Selbstligand fungieren (Mavaddat *et al.* 2000). Monoklonale, SLAM-spezifische Antikörper vermögen eine multimodale Aktivierung von B- und T-Lymphozyten auszulösen (Cocks *et al.* 1995, Sidorenko & Clark 1993). Die biologische Bedeutung des immunmodulierenden Moleküls SLAM ist umso klarer, wenn man bedenkt, dass Mutationen oder Deletionen des die Funktion von SLAM kontrollierenden SLAM-assoziierten Proteins den schweren Immundefekt des lymphoproliferativen Syndroms verursachen (Nichols *et al.* 2005). Eine schematische Darstellung von SLAM bietet Abbildung 1.3.

SLAM wurde erstmals 2000 als zellulärer Rezeptor für attenuierte und virulente Masernvirusstämme beschrieben und im Jahr darauf bestätigt (Erlenhoefer *et al.* 2001, Hsu *et al.* 2001, Tatsuo *et al.* 2000b). Es scheint niederaffin mit Impf- und hochaffin mit Wildtypstämmen zu interagieren (Erlenhofer *et al.* 2002, Ono *et al.* 2001b). Für die Masernvirusbindung ist die äußere, variable Domäne V essentiell (Ohno *et al.* 2003, Ono *et al.* 2001a). Auch SLAM wird von der Oberfläche der Wirtszelle nach Kontakt

oder Infektion mit Masernviren herabreguliert (Erlenhoefer *et al.* 2001, Tanaka *et al.* 2002, Welstead *et al.* 2004). Wegen seiner immunmodulierenden Funktion und seiner Interaktion mit Masernviren wird SLAM eine bedeutende Rolle bei der masernvirus-induzierten Immunsuppression zugeschrieben (Dhiman *et al.* 2004, Hahm *et al.* 2003, Hahm *et al.* 2004, Sidorenko & Clark 2003).

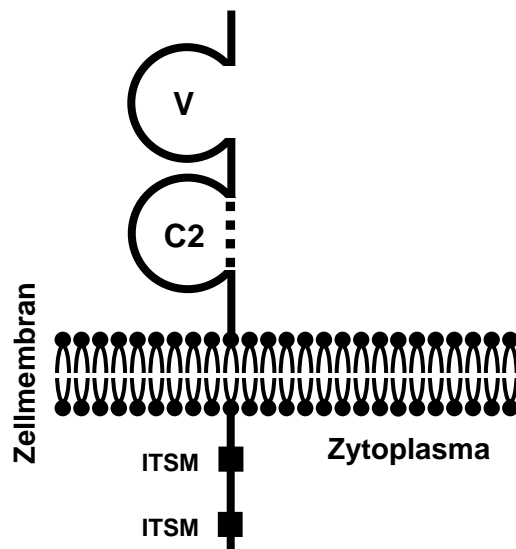


Abbildung 1.3: Schematische Darstellung der membrangebundenen Form von SLAM.

Schematische Darstellung der membrangebundenen Form von SLAM, das durch eine variable distale Domäne V und eine konstante proximale Domäne C2 gekennzeichnet ist. Das zytosolische Ende mit den zwei tyrosinhaltigen Motiven ITSM ist für die intrazelluläre Signalübertragung notwendig (modifiziert nach Sidorenko & Clark 2003).

1.2.3 Pathophysiologie und Pathogenese der Masernvirusinfektion

Die Eintrittspforte für Masernviren in den menschlichen Organismus bilden der obere und untere Respirationstrakt, vermutlich auch die konjunktivalen Schleimhäute. Mit der Infektion von nasopharyngealen, trachealen und bronchialen Epithelzellen transportieren infizierte mukosale Makrophagen und dendritische Zellen das Masernvirus in die lokalen, drainierenden Lymphknoten, wo erste Anzeichen einer Infektion als Synzytienbildung oder Untergang lymphatischen Gewebes sichtbar werden. Von hier aus breitet sich das Virus in einer ersten Virämiephase in das gesamte retikuloendotheliale System,

hier besonders in weitere Lymphknoten und die Milz, und den übrigen Respirationstrakt aus. Im lymphatischen Gewebe und an den epithelialen Oberflächen des Respirationstrakts entstehen Warthin-Finkeldey-Zellen, Riesenzellen mit eosinophilen, zytoplasmatischen Einschlusskörperchen. In einer zweiten Virämiephase breitet sich das Virus nun endgültig systemisch aus und befällt Haut, Schleimhäute, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Leber, Nieren und Harnblase. Das Virus repliziert dort vorwiegend in Endothelzellen, Epithelzellen oder Monozyten. Eine Entzündungsreaktion mit Vasodilatation, Permeabilitätssteigerung und Ödembildung, mononukleärer Infiltration und Infektion des umgebenden Gewebes ist die Folge (Griffin 2001, Katz 1995, Weissbrich *et al.* 2003).

Die Symptome der Prodromalphase werden durch die systemische Infektion und die Zerstörung der epidermalen Schutzschicht der nasopharyngealen und tracheobronchialen Schleimhäute gekennzeichnet. Die apikale Freisetzung replizierter Masernviren fördert deren weitere epitheliale Ausbreitung und führt zu einer effizienten Infektiosität des Patienten (Weissbrich *et al.* 2003).

Histopathologisch scheint die initiale Infektion von dermalen, kapillären Endothelzellen bei der Entstehung des charakteristischen makulopapulösen Exanthems die entscheidende Rolle zu spielen. Einzelne Berichte gehen von der Ausbreitung der Infektion auf epidermale Keratinozyten aus (Griffin 2001, Takahashi *et al.* 1996). Eher scheint jedoch eine Überempfindlichkeitsreaktion vom verzögerten Typ eine perikapilläre zytotoxische Entzündungsreaktion auszulösen, die zur Ödembildung, Epithelzellnekrose und mononukleärer Infiltration und damit zu den typischen Effloreszenzen führt (Kimura *et al.* 1975, Weissbrich *et al.* 2003).

Die pathogenetischen Faktoren für die Entstehung neurologischer Komplikationen sind noch weitgehend unbekannt. Ursächlich für die Entstehung der akuten postinfektiösen Masernenzephalomyelitis wird eine autoimmunologisch vermittelte Reaktion favorisiert, die gegen das basische Myelinprotein gerichtet ist, eine Demyelinisierung nach sich zieht und möglicherweise auf einem molekularen Mimikry beruht (Griffin 2001, Weissbrich *et al.* 2003). Die neuropathologische Begutachtung bei der *measles inclusion body encephalitis* zeigt eine massive Ansammlung eosinophiler, aus Nukleokapsid bestehender Einschlusskörperchen in Neuronen und glialen Zellen. Durch eine fehlerhafte Replikation und Mutationen im gesamten Masernvirusgenom werden keine kompletten

und damit infektiösen Masernviruspartikel vervielfältigt. Die intrazerebrale Ausbreitung der Ribonukleoproteinkomplexe wird durch mögliche interzelluläre Mikrofusionen erklärt (Weissbrich *et al.* 2003). Bei der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis wird neuropathologisch eine diffuse Enzephalitis der grauen und weißen Substanz vorgefunden. Endothelzellen, Neurone, Astrozyten, Oligodendrozyten und mikrogliale Zellen beherbergen dabei große Nukleokapsideinschlüsse. Der pathogenetische Ablauf dieser progredienten Erkrankung ist trotz intensiver Bemühungen noch weitgehend unbekannt. Sequenzuntersuchungen lassen einen klonalen Ursprung der Masernvirusproteine vermuten. Eine defiziente Masernvirusreplikation und eine überschießende Immunantwort scheinen zu einer langsamen interneuronalen Ausbreitung von Masernvirusproteinen zu führen, die nicht von einem speziellen neurotrophen Masernvirusstamm, sondern von einem gewöhnlichen Wildtypstamm herrühren (Griffin 2001, Weissbrich *et al.* 2003).

1.3 Das vaskuläre Endothel

1.3.1 Strukturelle und topologische Klassifizierung von Epithelien

Das Epithel ist in der anatomischen Gewebelehre das Grenzgewebe, das die Oberfläche des menschlichen Körpers bedeckt und seine inneren Hohlräume und Gangsysteme auskleidet. Es wird als eigenständiger Gewebetyp von Bindegewebe, Fettgewebe, Knorpel- und Knochengewebe, Muskelgewebe und Nervengewebe unterschieden und kann nach seiner Struktur und Topologie klassifiziert werden. Bis auf wenige Ausnahmen besitzen alle Epithelformen gemeinsame Merkmale. Sie bestehen aus einem soliden Zellverband ohne Blutgefäßversorgung, begrenzen luft- oder flüssigkeitsgefüllte Kompartimente und werden mit dem umgebenden Gewebe durch eine Basallamina verbunden. Epithelien entwickeln sich embryologisch aus dem Ektoderm, dem Mesoderm oder dem Endoderm (Drenckhahn 2003b).

Strukturell unterscheiden sich die verschiedenen Epithelformen in ihrem Aufbau und ihrer Oberflächendifferenzierung. Epithelien kommen einschichtig, mehrschichtig oder als Übergangsepithel vor. Einfache, einschichtige Epithelzellverbände können aus

squamös flachen, kubischen oder zylindrischen Zellen bestehen, deren luminale bzw. apikale Oberfläche glatt ist oder einen Mikrovillisaum oder Kino- bzw. Stereozilien aufweist. Bei den mehrreihigen Epithelien haben alle Zellen Kontakt zur Basallamina, aber nicht alle Epithelzellen erreichen die luminale bzw. apikale Oberfläche. Das Übergangsepithel ist eine spezialisierte Epithelform des Harntrakts. Mehrschichtige Epithelien bestehen aus in Schichten übereinander gelagerten Epithelzellen, die an der luminalen bzw. apikalen Oberfläche hochprismatisch oder squamös, ob verhornt oder unverhornt, vorliegen können (Drenckhahn 2003b).

Topologisch können Epithelien nach ihrer Lage unterteilt und damit in verschiedene Gruppen eingeteilt werden. Exoepithelien umfassen das Epithel der Körperoberfläche und alle Epithelien mit direkter oder indirekter Verbindung zu ihr. Endoepithelien kleiden innere Hohlräume aus, die keine Verbindung zur Körperoberfläche besitzen. Zu dieser Gruppe gehören die Gefäßendothelien. Daneben können noch weitere spezialisierte Epithelien von exokrinen wie endokrinen Drüsen oder Sinnesorganen abgegrenzt werden (Drenckhahn 2003b).

1.3.2 Morphologie und Funktion des Gefäßendothels

Die Morphologie und Funktion von Gefäßendothelien ist von ihrer anatomischen Lage und ihrem vielfältigen Aufgabengebiet abhängig. Die geschlossene Endothelzellschicht der Arterien nimmt den Schub des vorbeifließenden Bluts auf und ist wegen der hohen Scherkräfte längs zum Blutstrom ausgerichtet. Die Endothelausstattung venöser Gefäße reicht von einschichtigen bis mehrschichtigen und von lückenhaften bis lückenlosen Endothelzellverbänden. Die Kapillaren der terminalen Strombahn sind aus einem unterbrochenen oder lückenlosen Endothel zusammengesetzt, das Fenestrationen oder Poren enthält, von einer kontinuierlichen oder unterbrochenen Basallamina umgeben und lückenlos oder lückenhaft von perikapillären Zellen umhüllt sein kann (Bennett *et al.* 1959, Staubesand 1994). Eine wichtige Voraussetzung für die endotheliale Integrität und die endothelspezifischen Funktionen ist die Ausbildung von interzellulären Adhäsionskontakten und extrazellulären Verankerungsstrukturen. Haftproteine, unter ihnen Cadherine, Zelladhäsionsmoleküle der Immunglobulinsuperfamilie, Selektine und Integrine,

bilden Zell-Zell- oder Zell-Substrat-Kontakte aus. Die interzelluläre Haftung wird durch *Puncta adhaerentia*, *Fasciae adhaerentes*, *Zonulae adhaerentes* und *Maculae adhaerentes* vermittelt, *Zonulae occludentes*, die sogenannten *tight junctions*, riegeln den Interzellulärspace quasi hermetisch ab (Drenckhahn 2003a).

Das Funktionsspektrum von vaskulären Endothelzellen ist vielseitig. Sie sind an der Angiogenese durch Aussprossung und Synthese von Wachstumsfaktoren maßgeblich beteiligt. Da Endothelzellen vasokonstriktorische und vasodilatatorische Faktoren, z. B. Endothelin oder Stickstoffmonoxid, sezernieren können, spielen sie eine zentrale Rolle bei der Regulation der Gefäßweite. Zudem können sie durch die Sekretion oder Bindung sowie Aktivierung oder Inaktivierung von Gerinnungsfaktoren einen entscheidenden Einfluss auf die hämostaseologische Balance ausüben. Ein für Endothelzellen spezifisches Syntheseprodukt ist der von-Willebrand-Faktor, der in den Weibel-Palade-Körperchen gespeichert wird und luminal an das Plasma wie basolateral an das subendotheliale Bindegewebe abgegeben wird. Eine weitere Stoffwechsellistung besteht in der Synthese von Faser- und Proteoglykankomponenten für das subendotheliale Bindegewebe, z. B. Kollagene oder Fibronectin. Eine elementare Stellung nehmen Endothelzellen bei immunologisch-inflammatorischen Prozessen ein. Sie interagieren mit den Zellen des Immunsystems über eine Reihe von Zytokinen und vermitteln die Diapedese von Leukozyten durch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen, deren endothelzellspezifischer Vertreter E-Selektin oder CD62E ist. Die antigenpräsentierende Eigenschaft von Endothelzellen wird durch die mögliche Induktion von HLA-Klasse-II-Molekülen unterstrichen. Über ihre Funktion als physikalische Barriere gegenüber dem umliegenden Gewebe hinaus vermitteln Endothelzellen teils komplexe, spezifische Transportvorgänge für den Flüssigkeits- und Stoffaustausch, sei es durch einfache Diffusion, durch aktiven Transport, durch regulierte Endozytose oder durch erhöhte interendotheliale Gefäßpermeabilität (Staubesand 1994).

Eine besondere Stellung kommt vaskulären Endothelzellen beim Aufbau der Blut-Hirn- oder Blut-Liquor-Schranke zu, die das zentrale Nervensystem vom systemischen Blutkreislauf anatomisch und physiologisch trennen. Die klassische Blut-Hirn-Schranke ist aus einer kapillären Endothelzellschicht, aus einer sie umgebenden Basallamina, aus Perizyten und aus der aus astrozytären Fortsätzen bestehenden *Membrana limitans gliae*

perivascularis aufgebaut und für den Schutz des zentralen Nervensystems vor toxischen Substanzen sowie für spezifische Transportvorgänge und immunologische Prozesse von essentieller Bedeutung (Pardridge 1999, Rubin & Staddon 1999, Zenker 1993a). Die Blut-Liquor-Schranke des *Plexus choroideus* ist durch fenestrierte Kapillaren, ein bindegewebiges Stroma und ein liquorbildendes, kubisches Epithel gekennzeichnet (Zenker 1993b). Dabei formieren sich die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke und die Epithelzellen der Blut-Liquor-Schranke jeweils zu einer hochdifferenzierten Zellschicht, die einen selektiven, transzytären Stoffaustausch gewährleistet und eine unkontrollierte, parazelluläre Permeabilität durch die Existenz von *Zonulae occludentes* verhindert oder zumindest erschwert (Pardridge 1999, Rubin & Staddon 1999, Zenker 1993a/b).

1.4 Aufgabenstellung und Ziel der Arbeit

Die physikalische und funktionelle Integrität des vaskulären Endothels ist eine wichtige Voraussetzung für die Aufrechterhaltung der physiologischen Balance im Gesamtorganismus. Infizierte Gefäßendothelzellen können entscheidend zur Pathogenese der akuten Masern, zu den durch das Masernvirus verursachten Komplikationen und zur viral induzierten Immunsuppression beitragen.

Das Ziel der Arbeit besteht darin, die Interaktion von attenuierten und virulenten Masernvirusstämmen mit humanen Gefäßendothelzellen grundlegend und systematisch zu untersuchen und eine Basis für die Definition pathogenetischer molekularer Mechanismen zu schaffen. Hierzu soll die Kultur primärer humaner Endothelzellen der Nabelschnurvene im hauseigenen Laboratorium organisiert und etabliert werden und die mit dem SV40-Large-T-Antigen transfizierte humane mikrovaskuläre Hirnendothelzelllinie in Kultur genommen werden. An ihnen soll eine Erhebung des Masernvirusrezeptorstatus nativ und nach Stimulation vorgenommen, die Bindung von Masernviren untersucht und die Infizierbarkeit mit attenuierten und virulenten Masernvirusstämmen und deren Replikation in der Endothelzellkultur analysiert werden.

2 Material

2.1 Zellen

Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene, sogenannte *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC), dienen in der Endothelzellforschung als etabliertes *in-vitro*-Modell für die zellbiologische Funktionalität vaskulärer Endothelzellen. Dabei handelt es sich um frisch isolierte, primäre endotheliale Zellen, die sich auch *ex vivo* ähnlich wie in ihrer physiologischen Umgebung verhalten und die nicht durch eine molekularbiologische Manipulation, z. B. in Form einer Immortalisierung, verändert worden sind. Weitere Vorteile sind die recht einfache Gewinnung und die breite wissenschaftliche Erfahrung seit der Erstbeschreibung (Jaffe *et al.* 1973).

HUVEC werden aus der menschlichen Nabelschnurvene durch Enzymverdauung gewonnen und anschließend kultiviert. Die hierfür nötigen Nabelschnüre wurden mit Genehmigung und freundlicher Unterstützung des Kreißsaalteams der Universitäts-Frauenklinik Würzburg in anonymisierter Form in Empfang genommen und weiterverarbeitet. Die humane, mit dem SV40-Large-T-Antigen transfizierte und immortalisierte, mikrovaskuläre Hirnendothelzelllinie *human brain microvascular endothelial cells* (HBMEC) war eine freundliche Gabe von Herrn Prof. Kwang Sik Kim, MD, von der Abteilung für pädiatrische Infektiologie des Fachbereichs Pädiatrie der Johns-Hopkins-Universität in Baltimore, Maryland, Vereinigte Staaten von Amerika.

Die übrigen Zelllinien waren allesamt am Institut für Virologie und Immunbiologie verfügbar. Eine Übersicht über die Zellarten und deren Herkunftsspezies gewährt Tabelle 2.1.

Bezeichnung	Beschreibung	Spezies
HUVEC	primäre Endothelzellen der Nabelschnurvene	Mensch (<i>Homo sapiens sapiens</i>)
HBMEC	mikrovaskuläre, SV40-Large-T-Antigen-transformierte Hirndothelzellen	Mensch (<i>Homo sapiens sapiens</i>)
B95a	semiadhärenter Subklon der EBV-transformierten B-Zelllinie B95-8	Weißbüschelaffe (<i>Callithrix jacchus</i>)
BJAB	lymphoblastoide, EBV-transformierte B-Zelllinie	Mensch (<i>Homo sapiens sapiens</i>)
HeLa	Epithelzellen des Zervixkarzinoms	Mensch (<i>Homo sapiens sapiens</i>)
Vero	Epithelzellen der Niere	afrikanische Grüne Meerkatze (<i>Chlorocebus aethiops</i> *)
CHO-K1	Ovarialzellen	chinesischer Streifenhamster (<i>Cricetulus griseus</i>)
CHO-5.3	CD46-transfizierte und -exprimierende Ovarialzellen	chinesischer Streifenhamster (<i>Cricetulus griseus</i>)
CHO-SLAM	SLAM-transfizierte und -exprimierende Ovarialzellen	chinesischer Streifenhamster (<i>Cricetulus griseus</i>)

Tabelle 2.1: Übersicht über die verwendeten Zellarten und deren Herkunftsspezies.

(*) ältere Nomenklatur: *Cercopithecus aethiops*

2.2 Virusstämme

Sämtliche verwendeten attenuierten und virulenten Masernvirusstämme waren am Institut für Virologie und Immunbiologie Würzburg verfügbar. Die virulenten Masernvirusisolate mit dem Präfix Wü wurden vor einigen Jahren aus dem Urin von Patienten mit einer klinisch und serologisch gesicherten Maserkrankung isoliert, amplifiziert

und kryokonserviert. Der Impfvirusstamm Edm war bisher über Vero-Zellen, die Wildtypvirusstämme waren über BJAB-Zellen passagiert worden. Eine detaillierte Übersicht gewährt Tabelle 2.2.

Abkürzung	Bezeichnung	Genotyp	Jahr	Spezimen	Isolation
Edm	Edmonston B Vaccine/60s	A	1954	Blut	Vero
WTFb	Erlangen.DEU/90	C2	1990	Blut	BJAB
Wü4797	Würzburg.DEU/96/4797	D2	1996	Urin	BJAB
Wü5679	Würzburg.DEU/98/5679	C2*	1998	Urin	B95a
Wü7671	Würzburg.DEU/96/7671	D2*	1996	Urin	BJAB

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Masernvirusstämme.

Neben den international gebräuchlichen und geläufigen Kurzbezeichnungen sind die offiziellen Bezeichnungen der Virusstämme angegeben. Zudem sind der Genotyp, Angaben zum Jahr der Erstisolierung, zum Patientenspezimen, aus dem das Virus isoliert wurde, und die zur Erstisolierung benutzte Zellart angegeben.

(*) vermutlicher Genotyp

2.3 Antikörper und Antikörperseren

Eine Übersicht über die monoklonalen Primär- und polyklonalen Sekundärantikörper zeigen Tabellen 2.3 und 2.4 unter Angabe der Antigenspezifität, der Klonbezeichnung, der Zielspezies, der Herkunftsspezies und des Isotyps. Einige dieser aufgelisteten Antikörper waren ursprünglich am Institut für Virologie und Immunbiologie entwickelt, kloniert und benannt worden. Folgende Primärantikörper oder Seren wurden eingesetzt:

humanes, masernvirusspezifisches Hyperimmunserum eines an SSPE Erkrankten 12696
Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

- Maus-Anti-Masernvirus-Hämagglutininprotein-IgG₁-Antikörper K4
Maus-Anti-Masernvirus-Hämagglutininprotein-IgG_{2a}-Antikörper K83
Maus-Anti-Masernvirus-Hämagglutininprotein-IgG_{2a}-Antikörper L77
Maus-Anti-Masernvirus-Nukleokapsidprotein-IgG_{2a}-Antikörper F227
Maus-Anti-Mensch-CD9-IgG₁-Antikörper K41
Maus-Anti-Mensch-CD46 (SCR1)-IgG₁-Antikörper 13/42
Maus-Anti-Mensch-CD46 (SCR1)-IgG₁-Antikörper B97
 Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland
- Maus-Anti-Mensch-CD48-IgG₁-Antikörper 4H9 (Art.-Nr. sc-8397)
 Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
- Maus-Anti-Mensch-CD54-IgG₁-Antikörper 15.2 (Art.-Nr. C372)
 Leinco Technologies, St. Louis, Missouri, Vereinigte Staaten von Amerika
- Maus-Anti-Mensch-CD58-IgG₁-Antikörper TS2/9.1.4.3 (Art.-Nr. sc-20009)
 Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
- Maus-Anti-Mensch-CD62E-IgG₁-Antikörper 68-5H11 (Art.-Nr. 33361 A)
 PharMingen, Karlsruhe, Deutschland
- Maus-Anti-Mensch-CD150-IgG₁-Antikörper 5C6
 Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland
- Maus-Anti-Mensch-CD150-IgG₁-Antikörper A12 (Art.-Nr. 37701 A)
 PharMingen, Karlsruhe, Deutschland
- Maus-Anti-Mensch-CDw150-IgG₁-Antikörper IPO-3 (Art.-Nr. MC-720)
 Kamiya, Seattle, Washington, Vereinigte Staaten von Amerika
- Maus-Anti-Mensch-HLA-DR α -IgG₁-Antikörper TAL.1B5 (Art.-Nr. M 0746)
 Dako, Hamburg, Deutschland
- Maus-Anti-Mensch-HLA-Klasse-I-IgG_{2a}-Antikörper W6/32
 Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

Maus-Anti-Mensch-vWF-IgG₁-Antikörper 2F2-A9 (Art.-Nr. 34571 D)

PharMingen, Karlsruhe, Deutschland

Klonbezeichnung	Zielmolekül	Zielspezies	Herkunftsspezies	Isotyp
K4	H	Masernvirus	Maus	IgG ₁
K83	H	Masernvirus	Maus	IgG _{2a}
L77	H	Masernvirus	Maus	IgG _{2a}
F227	N	Masernvirus	Maus	IgG _{2a}
K41	CD9	Mensch	Maus	IgG ₁
13/42	CD46	Mensch	Maus	IgG ₁
B97	CD46	Mensch	Maus	IgG ₁
4H9	CD48	Mensch	Maus	IgG ₁
15.2	CD54	Mensch	Maus	IgG ₁
TS2/9.1.4.3	CD58	Mensch	Maus	IgG ₁
68-5H11	CD62E	Mensch	Maus	IgG ₁
5C6	CD150	Mensch	Maus	IgG ₁
A12	CD150	Mensch	Maus	IgG ₁
IPO-3	CDw150	Mensch	Maus	IgG ₁
TAL.1B5	HLA-DR α	Mensch	Maus	IgG ₁
W6/32	HLA-Klasse-I	Mensch	Maus	IgG _{2a}
2F2-A9	vWF	Mensch	Maus	IgG ₁

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten monoklonalen Primärantikörper.

Folgende Sekundärantikörper wurden eingesetzt:

Alexa Fluor[®] 488-konjugierter Ziege-Anti-Maus-IgG (H+L)-IgG-Antikörper
(Art.-Nr. A-11001)

Alexa Fluor[®] 594-konjugierter Ziege-Anti-Maus-IgG (H+L)-IgG-Antikörper
(Art.-Nr. A-11005)

Molecular Probes, Leiden, Niederlande

FITC-konjugierter Kaninchen-Anti-Maus-Ig-IgG-Antikörper (Art.-Nr. F 0261)

FITC-konjugierter Schwein-Anti-Mensch-Ig-Antikörper (Art.-Nr. n. b.)

Dako, Hamburg, Deutschland

HRPO-konjugierter Ziege-Anti-Maus-IgG (H+L)-IgG-Antikörper

(Art.-Nr. 115-035-003)

Dianova, Hamburg, Deutschland

RPE-konjugierte Kaninchen-Anti-Maus-Ig-F(ab')₂-Fragmente (Art.-Nr. R 0439)

Dako, Hamburg, Deutschland

Zielmolekül	Zielspezies	Herkunftsspezies	Isotyp	Konjugat
IgG (H+L)	Maus	Ziege	IgG	Alexa Fluor [®] 488
IgG (H+L)	Maus	Ziege	IgG	Alexa Fluor [®] 594
IgG, IgM, IgA	Maus	Kaninchen	IgG	FITC
Ig, v. a. IgG	Mensch	Kaninchen	Ig	FITC
IgG (H+L)	Maus	Ziege	IgG	HRPO
Ig, v. a. IgG	Maus	Kaninchen	F(ab') ₂	RPE

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten konjugierten, polyklonalen Sekundärantikörper.

2.4 Lektindetektion und Kernfärbung

Ulex-europaeus-Agglutinin I wurde als biotinyliertes Lektin von fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Streptavidin detektiert. Zur Gegenfärbung von Zellkernen bei der Immunfluoreszenzmikroskopie wurde der DNA-interkalierende Farbstoff DAPI verwendet:

4',6-Diamidino-2-phenylindol-dihydrochlorid DAPI (D-1306)

Alexa Fluor[®] 594-konjugiertes Streptavidin (Art.-Nr. S-11227)

Molecular Probes, Leiden, Niederlande

biotinyliertes Ulex-europaeus-Agglutinin I (Art.-Nr. B-1065)

Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika

FITC-konjugiertes Streptavidin (Art.-Nr. F0422)

Dako, Hamburg, Deutschland

2.5 Enzyme

Für die Isolation von Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene, die Kultur adhärenter Zellen und die Molekularbiologie fanden die folgenden Enzyme und Enzymlösungen Verwendung:

ATV

(8,0 g/l NaCl, 0,4 g/l KCl, 1,0 g/l D(+)-Glucose, 0,5 g/l NaHCO₃, 0,5 g/l Trypsin 1:250 und 0,2 g/l Versene ad *aqua dest.* und pH 7,4)

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

Collagenase A (Art.-Nr. 103 586)

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

SuperScript-II[™] Reverse Transcriptase (Art.-Nr. 18064-022)

Gibco, Karlsruhe, Deutschland

2.6 Zytokine, Mediatoren, Hormone und Endotoxine

Als Stimulantien fanden folgende Zytokine, Mediatoren, Hormone oder Endotoxine Verwendung:

Histamin (Art.-Nr. H-7125)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

natürliches, humanes Interferon- α (Art.-Nr. IFN α -15)

Strathmann Biotech, Hamburg, Deutschland

rekombinantes, humanes Interferon- γ (Art.-Nr. 11040596001)

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

rekombinantes, humanes Interleukin-1 β (Art.-Nr. IL1 β -10)

rekombinantes, humanes Interleukin-4 (Art.-Nr. IL4CC)

rekombinantes, humanes Interleukin-6 (Art.-Nr. IL6CC)

Strathmann Biotech, Hamburg, Deutschland

Lipopolysaccharide von *Escherichia coli* 055:B5 (Art.-Nr. L-6529)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

rekombinanter, humaner Tumor-Nekrose-Faktor- α (Art.-Nr. TNF α -10)

Strathmann Biotech, Hamburg, Deutschland

2.7 Nukleotide

Folgende Mono- oder Oligonukleotide und DNA-Standard-Leitern fanden Verwendung:

dNTP Mixes 2 mM (Art.-Nr. R0241)

GeneRulerTM 100 bp DNA Ladder (Art.-Nr. SM0243)

GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder (Art.-Nr. SM0313)

Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

p(dT)₁₅ (Art.-Nr. 814 270)

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Primerpaare für CD46, SLAM, TLR2 und β -Aktin (s. Tabelle 2.5)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Bezeichnung	Spezifität	Zielspezies	5'-3'-Sequenz
CD46 fw	CD46	Mensch	GCG CCG CGC ATG GAG CCT CCC G
CD46 rev			GGA GGC TTG TAA GTA GGC CTA G
CD150 fw	CD150	Mensch	CTC CTC ATT GGC TGA TGG ATC C
CD150 rev			GGA GTG GAG ACC TGC TCA TAA A
TLR2 fw	TLR2	Mensch	GCC AAA GTC TTG ATT GAT TGG
TLR2 rev			TTG AAG TTC TCC AGC TCC TG
β -Aktin fw	β -Aktin	Mensch	TGA CGG GGT CAC CCA CAC TGT GCC C
β -Aktin rev			CTA GAA GCA TTT GCG GTG GAC GAT

Tabelle 2.5: Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide.

2.8 Nährmedien und Seren

Als Nährmedien und Seren wurden die folgenden Substanzen und Produkte verwendet. Selbst erstellte Medien sind ohne Herstellerangaben aufgelistet:

ECGS (Art.-Nr. E-2759)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Einfriermedium

(90 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO)

FCS (Art.-Nr. S0115)

Biochrom, Berlin, Deutschland

Heparin 25.000 U (Art.-Nr. H-3149)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Mausserum (Art.-Nr. S25)

Millipore, Schwalbach, Deutschland

Medium 199 mit Earle-Salzen, L-Glutamin und 25 mM HEPES (Art.-Nr. 22340-020)

Gibco, Karlsruhe, Deutschland

MEM und MEM 2x

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

MEM non-essential amino acids 100x (Art.-Nr. M-7145)

MEM vitamin solution 100x (Art.-Nr. M-6895)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Natriumhydrogencarbonat 5,6 % (w/v)

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

Natriumpyruvat 100 mM (Art.-Nr. S-8636)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

NuSerumTM IV (Art.-Nr. 51004)

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Overlay-Agar

(25 % (v/v) MEM mit 5 % (v/v) FCS, 37,5 % (v/v) Agar 2 % (w/v), 37,5 % (v/v) MEM 2x)

RPMI 1640 mit L-Glutamin (Art.-Nr. 51800-043)

RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und GlutaMAXTM I (Art.-Nr. 72400-054)

Gibco, Karlsruhe, Deutschland

2.9 Lösungen und Puffer

Als Lösungen und Puffer fanden die folgenden Substanzen und Produkte Verwendung. Selbst erstellte Lösungen oder Puffer sind ohne Herstellerangaben aufgelistet:

Blockierpuffer

(5 % (w/v) Magermilchpulver ad TBS-T-Puffer)

DEPC-H₂O

(0,1 % (v/v) Diethylpyrrolidiniumcarbonat in *aqua dest.*)

destilliertes Wasser

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

DNA-/RNA-Farbpuffer 10x

(50 % (v/v) Glycerin, 0,4 % (v/v) Bromphenolblau, 0,4 % (v/v) Xylencyanol FF ad *aqua dest.*)

Elutionspuffer

(0,1 M Glycin-HCl ad *aqua dest.* und pH 2,7)

FACS-Puffer

(0,4 % (w/v) BSA, 0,02 % (w/v) Natriumazid in 1.000 ml PBS⁽⁻⁾)

First-Strand-Puffer 5x (Bestandteil von Art.-Nr. 18064-022)

Gibco, Karlsruhe, Deutschland

HBSS⁽⁻⁾ (Art.-Nr. L2045)

Biochrom, Berlin, Deutschland

HEPES (Art.-Nr. 9105.3)

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Laemmli-Probenpuffer

(7,0 ml Tris-HCl 4x mit pH 6,8, 1,0 g SDS, 3,0 ml Glycerin, 1,2 mg Bromphenolblau, 2,0 ml β -Mercaptoethanol, *aqua dest.* ad 10 ml Endvolumen)

Neutralrotlösung 1,6 % (w/v)

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

Lysispuffer

(1,0 % (v/v) NP-40-Alternative, 125 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM EDTA sowie 1 Tablette Proteaseinhibitor pro 50 ml Endvolumen ad *aqua dest.* und pH 7,4)

Paraformaldehyd 3,7 % (w/v)

(37 g Paraformaldehyd in 1.000 ml PBS⁽⁻⁾ oder PBS)

PBS

(8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 0,2 g/l KH₂PO₄, 0,167 g/l CaCl₂ · 4 H₂O und 0,1 g/l MgCl₂ · 6 H₂O ad *aqua dest.* und pH 7,4)

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

PBS⁽⁻⁾

(8,0 g/l NaCl, 0,2 g/l KCl, 1,15 g/l Na₂HPO₄ · 2 H₂O, 0,2 g/l KH₂PO₄ ad *aqua dest.* und pH 7,4)

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

PBS-T-Puffer

(0,05 % (v/v) TWEEN[®] 20 ad PBS und pH 7,4)

Proteingellaufpuffer

(3,03 % (w/v) Tris-Base, 14,4 % (v/v) Glycin, 1,0 % (w/v) SDS ad *aqua dest.*)

TAE-Puffer

(2 M Tris, 0,57 % (v/v) Essigsäure, 0,6 M EDTA ad *aqua dest.* und pH 8,0)

TBS-Puffer

(25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl ad *aqua dest.* und pH 7,4)

TBS-T-Puffer

(25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl, 0,05 % (v/v) TWEEN[®] 20 ad *aqua dest.* und pH 7,4)

Triton X-100 0,25 % (v/v)

(2,5 ml Triton X-100 in 1.000 ml PBS⁽⁻⁾ oder PBS)

Trypanblaulösung 0,4 % (w/v) (Art.-Nr. T-8154)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Waschpuffer A

(20 mM NaH₂PO₄, 20 mM NaHPO₄ ad *aqua dest.* und pH 7,4)

Western-Blot-Puffer I

(0,3 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol ad *aqua dest.* und pH 10,4)

Western-Blot-Puffer II

(0,025 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol ad *aqua dest.* und pH 7,4)

Western-Blot-Puffer III

(0,025 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol, 0,04 M Aminocaprinsäure ad *aqua dest.* und pH 9,4)

2.10 Chemikalien und Antibiotika

Folgende Chemikalien und Antibiotika wurden eingesetzt:

Acrylamid 4K-Lösung 30 %, Mix 37,5:1 (Art.-Nr. A1672)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Agar 2 % (w/v)

(2,0 g Bacto[™] Agar ad 100 ml *aqua dest.* und anschließende Autoklavierung)

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

UltraPure™ Agarose (Art.-Nr. 15510-027)

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Aminocaprinsäure (Art.-Nr. S-2504)

Ammoniumpersulfat (Art.-Nr. A-3678)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Bacto™ Agar (Art.-Nr. 214010)

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Bicinchoninsäurelösung (Art.-Nr. B-9643)

β-Mercaptoethanol (Art.-Nr. M-7154)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Bromphenolblau (Art.-Nr. A3640)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

BSA (Fraktion V) (Art.-Nr. 160069)

ICN Biomedicals, Illkirch, Frankreich

1-Butanol (Art.-Nr. A3066)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

DABCO (Art.-Nr. D-2522)

DEPC (Art.-Nr. D-5758)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Dimethylsulfoxid (Art.-Nr. A994.1)

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Dithiothreitol 0,1 M (Bestandteil von Art.-Nr. 18064-022)

Gibco, Karlsruhe, Deutschland

EDTA (Art.-Nr. E-6758)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Essigsäure (Art.-Nr. A0820)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Entwicklungs- und Fixierlösung

Kodak, Stuttgart, Deutschland

Ethanol absolut (Art.-Nr. A3693)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Ethidiumbromidlösung 500 µg/ml (Art.-Nr. E-1385)

Gelatin, Typ A, aus Schweinehaut (Art.-Nr. G-2500)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Glutardialdehyd (~50 % (v/v) in Wasser) (Art.-Nr. 4995.1)

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Glycerin (Art.-Nr. 00749)

Ferak Laborat, Berlin, Deutschland

Glycin (Art.-Nr. A1377)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Kombinationslösung aus 100 mg/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin in *aqua dest.* in Portionen zu 1,2 ml

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

Kupfer-II-Sulfat-Lösung 4 % (w/v) (Art.-Nr. B-2284)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Magermilchpulver Instant

Saliter, Obergünzburg, Deutschland

Methanol (Art.-Nr. 106009)

Merck, Darmstadt, Deutschland

Mineralöl (Art.-Nr. 194836)

ICN Biomedicals, Illkirch, Frankreich

MOWIOL[®] 4-88 (Art.-Nr. 475904)

Calbiochem, Nottingham, England

Natriumazid (Art.-Nr. S-2002)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Natriumchlorid (Art.-Nr. A2942)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Natriumhydrogenphosphat (Art.-Nr. 6346)

Merck, Darmstadt, Deutschland

Natriumdihydrogenphosphat (Art.-Nr. 01143)

Ferak Laborat, Berlin, Deutschland

Natriumhydroxid-Maßlösung 1 M (Art.-Nr. A1432)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

NP-40-Alternative (Art.-Nr. 492016)

Calbiochem, Nottingham, England

Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Art.-Nr. 11873580001)

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Paraformaldehyd (Art.-Nr. A3813)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Propidiumiodidlösung 1,0 mg/ml (Art.-Nr. P-4864)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Protein G Sepharose[™] 4 Fast Flow (Art.-Nr. 17-0618-01)

GE Healthcare, München, Deutschland

Proteinstandard Kaleidoscope Prestained Standards (Art.-Nr. 161-0324)

Bio-Rad, München, Deutschland

Proteinstandardlösung 1,0 mg/ml (Art.-Nr. P-0914)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

RNaseOUT™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor (Art.-Nr. 10777-019)

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Salzsäure-Maßlösung 1 M (Art.-Nr. A1434)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Natriumdodecylsulfat (Art.-Nr. L-3771)

TEMED (Art.-Nr. T-9281)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Tris (Art.-Nr. A1086)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Triton X-100 (Art.-Nr. X100)

TWEEN® 20 (Art.-Nr. P-1379)

Xylencyanol FF (Art.-Nr. X-4126)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

2.11 Kits

Es wurden folgende Kits verwendet:

Alexa Fluor® 488 Monoclonal Antibody Labeling Kit (Art.-Nr. A-20181)

Molecular Probes, Leiden, Niederlande

Amersham ECL™ Western Blotting Detection Reagents (Art.-Nr. RPN2106)

GE Healthcare, München, Deutschland

GenElute™ Mammalian Total RNA Purification Kit (Art.-Nr. RTN10)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Mycoplasma Plus™ PCR Primer Set (Art.-Nr. 302008)

Stratagene, La Jolla, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika

PuRe Taq Ready-To-Go™ PCR Beads (Art.-Nr. 27-9558-01)

GE Healthcare, München, Deutschland

2.12 Ein- und Mehrwegmaterialien

Steriles Einwegmaterial für Experimente in den Bereichen Zellkultur, Proteinbiochemie und Molekularbiologie wurden von Eppendorf, Hamburg, greiner bio-one, Frickenhausen, Nalge Nunc, Wiesbaden, und Sarstedt, Nümbrecht, alle Deutschland, bezogen. Sehr häufig verwendete oder spezielle Materialien sind nachstehend aufgeführt. Sterilisierbare Schraubverschlussflaschen, Erlenmeyerkolben, Vakuumüberlaufflaschen oder Glaspipetten verschiedener Größe wurden von Schott, Mainz, Deutschland, geliefert.

Deckgläser

Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland

Dialyseschläuche Typ 27/32

Serva, Heidelberg, Deutschland

Durchflusszytometrierröhrchen (Art.-Nr. RE03)

Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Einmalhandschuhe

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Braun, Melsungen, Deutschland

Einmalskalpelle

Zentrallager des Universitätsklinikums Würzburg, Deutschland

Elektrophoreseapparatur

Gelträger

Glasarbeitsplatte

Kämme verschiedener Größe

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

Kammerobjektträger Lab-Tek[®] II Chamber Slide[™] System aus Permanox[®]
mit 2 (Art.-Nr. 177429), 4 (Art.-Nr. 177437) oder 8 Kammern (Art.-Nr. 177445)

Nalge Nunc, Wiesbaden, Deutschland

Kryokonservierungsröhrchen (Art.-Nr. 122 2XX)

greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Membranfilter 0,2 µm mit 47 mm Durchmesser

Nitrozellulosetransfermembran Protran[®] 0,45 µm

Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Pasteurpipetten

Nalge Nunc, Wiesbaden, Deutschland

Pipettenspitzen

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Rollerkulturflaschen

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Röntgenfilme

Kodak, Stuttgart, Deutschland

20-ml-Spritzen Primo

Büttner-Frank, Erlangen, Deutschland

Millex[®]-GS oder -HA Ultracleaning Filter Unit 0,22 oder 0,45 µm

Millipore, Schwalbach, Deutschland

Einmalküvetten UVette®

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Venenverweilkatheter Vasculon® Plus 16 G

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

handelsübliche Wäscheklammer

Whatman-Papier Typ GB002 (Art.-Nr. 013151)

Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Zellkulturflaschen Cellstar™ mit Filter

Größen 25 cm² oder 50 ml (Art.-Nr. 690 175), 75 cm² oder 250 ml (Art.-Nr. 668 175),
175 cm² oder 550 ml (Art.-Nr. 660 175) oder 175 cm² oder 650 ml (Art.-Nr. 661 175)
greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Zellkulturflaschen Cellstar™ ohne Filter

Größen 25 cm² oder 50 ml (Art.-Nr. 690 170), 75 cm² oder 250 ml (Art.-Nr. 658 170),
175 cm² oder 550 ml (Art.-Nr. 660 160) oder 175 cm² oder 650 ml (Art.-Nr. 661 160)
greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Zellkulturplatten 6 Wells (Art.-Nr. 657 160)

greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Zellkulturplatten Costar® 12 Wells (Art.-Nr. 3512)

Corning, Corning, New York, Vereinigte Staaten von Amerika

Zellkulturplatten 24 Wells (Art.-Nr. 662 160)

Zellkulturplatten 48 Wells (Art.-Nr. 677 180)

15-ml-Zentrifugenröhrchen (Art.-Nr. 188 261)

50-ml-Zentrifugenröhrchen (Art.-Nr. 227 261)

greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

2.13 Apparaturen und Geräte

Die Experimente wurden in einem Laboratorium der Sicherheitsstufe 2 des Instituts für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland, durchgeführt. Es standen neben den folgend aufgeführten Geräten ein Brutraum mit 37 °C, ein Kühlraum mit 4 °C, ein Gefrierraum mit –20 °C und Aufbewahrungstanks mit flüssigem Stickstoff zur Verfügung. Soweit nicht anders angegeben, wurden Zentrifugationsschritte in der Standzentrifuge Rotixa KS vorgenommen.

Analysewaage

Sartorius, Göttingen, Deutschland

Autoklav 23

MELAG Medizintechnik, Berlin, Deutschland

BioPhotometer 6131

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Blottingapparatur

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

Brutschränke 33 und 37 °C

Heraeus, Hanau, Deutschland

Digitalkamera DC 300F

Leica Microsystems, Wetzlar, Deutschland

Durchflusszytometer FACScanTM mit Software Lysis IITM und CellQuestTM

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Eismaschine AF30

Scotsman, Mailand, Italien

Filterapparatur

n. b.

Fluoreszenzmikroskop Aristoplan

Inversmikroskop Labovert FS

Leitz, Wetzlar, Deutschland

Kühlschrank 4 °C

Siemens, München, Deutschland

Bauknecht, Schorndorf, Deutschland

Magnetheizrührer Ikamag RCT

IKA Labortechnik, Staufen, Deutschland

Mikropipetten

Eppendorf, Hamburg, Deutschland

Mikrowellengerät

Panasonic, Hamburg, Deutschland

Netzgerät

Gibco, Karlsruhe, Deutschland

pH-Meter

Wissenschaftlich-Technische Werkstätten, Weilheim, Deutschland

Rotoren JA-10 und JA-20

Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

Proteinchromatographie

Pharmacia LKB, GE Healthcare, München, Deutschland

Standzentrifuge J2-MC

Beckman Coulter, Krefeld, Deutschland

Standzentrifuge Rotixa KS

Hettich, Tuttlingen, Deutschland

Sterilwerkbank

Gelaire, Sydney, Australien

Thermal Cycler DNA 480

Perkin Elmer, Boston, Massachusetts, Vereinigte Staaten von Amerika

Tiefkühltruhe –80 °C

Revco, Asheville, North Carolina, Vereinigte Staaten von Amerika

Tiefkühlschrank –20 °C

Siemens, München, Deutschland

Bosch, Stuttgart, Deutschland

Tischzentrifuge Millifuge

Millipore, Schwalbach, Deutschland

Transilluminator

Ultraviolettlichteinheit

Vilber Lourmat, n. b., Frankreich

Vortexer

Wasserbad

GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, Deutschland

Wippschüttler

Edmund Bühler, Tübingen, Deutschland

Zählkammer nach Neubauer

Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Gewinnung von Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene

3.1.1.1 Ansetzen der Enzymlösung

500 mg lyophilisierte Collagenase A, ein aus *Clostridium histolyticum* isoliertes, ungereinigtes Gemisch aus Clostridiopeptidase A, Proteasen, Polysaccharidasen und Lipasen, werden in 1.000 ml steriler PBS gelöst. Da die lyophilisierte Collagenase A herstellungsbedingt nicht als steril anzusehen ist, wird diese Lösung zur Minderung des Kontaminationsrisikos mittels einer sterilisierten Filterapparatur für wässrige Lösungen gereinigt, indem ein Vakuum an eine einem Membranfilter von 0,2 µm Porengröße nachgeschaltete Auffangkammer angelegt wird. Die gefilterte Kollagenase-A-Lösung wird dann in Portionen zu etwa 40 ml, ausreichend zur Verarbeitung von etwa zwei Nabelschnüren von jeweils etwa 25 cm Länge, in sterile, 50 ml fassende Zentrifugationsröhrchen überführt, zur Vermeidung von Aktivitätsverlusten rasch eingefroren und bis zu drei Monate bei –20 °C aufbewahrt. Zeitnah vor der anstehenden Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene kann diese Lösung bei Raumtemperatur oder im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und nach Erwärmung auf eine Temperatur von 37 °C bei maximaler Enzymaktivität verwendet werden.

3.1.1.2 Isolierung der Endothelzellen

Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene, sogenannte *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC), können durch Enzymbehandlung aus der Nabelschnurvene gewonnen und anschließend kultiviert werden. Die Isolationsmethode folgt weitgehend dem ursprünglichen und weiterentwickelten Protokoll (Jaffe *et al.* 1973), das kürzlich noch einmal anschaulich zusammengefaßt wurde (Marin *et al.* 2001).

Die Nabelschnur wird zunächst kindsnah abgeklemmt und mit einem scharfen Skalpell nahe der Abklemmungsstelle und nahe der Plazenta durchtrennt. Um einer Austrocknung und einer bakteriellen Besiedlung entgegenzuwirken, wird die Nabelschnur in einem sterilen geschlossenen Glasgefäß mit Schraubverschluss, das mit etwa 80 ml steriler, mit einer Zweifachkombination Antibiotika versetzter PBS gefüllt ist, im Kühlschrank bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert.

Möglichst früh und innerhalb einer Zeitspanne von höchstens 12 h wird mit der Isolierung von Endothelzellen der Nabelschnurvene begonnen. Obwohl die Nabelschnur vom Kind und der Plazenta nicht unter streng sterilen Bedingungen entnommen werden konnte, werden zur Verringerung des Kontaminationsrisikos im Vorfeld der Zellkultur ein steriler Arbeitsplatz und sterile Instrumente für die Isolierung vorausgesetzt. Unter der Sicherheitswerkbank wird der Arbeitsplatz eingerichtet.

Zuerst wird die menschliche Nabelschnur aus dem Glas herausgenommen, kurz in 70 % (v/v) technisches Ethanol eingetaucht und in steriler PBS bis zur unmittelbaren Verarbeitung eingelegt. Beide Enden der Nabelschnur werden auf einer sterilen Glasarbeitsplatte mit einem Skalpell um etwa 1 cm gekürzt, die Reststücke verworfen. Aus einem 16 G dicken Venenverweilkatheter wird die Kanüle entfernt. Nun wird die Nabelschnurvene aufgesucht und gegenüber den beiden Nabelschnurarterien abgegrenzt. Der verbliebene Katheter wird vorsichtig in die Vene eingeschoben und mit einer handelsüblichen, sterilisierten Wäscheklammer so fixiert, daß auch unter erhöhtem intravenösem Druck keine Flüssigkeit aus der Vene entweichen kann. Nun wird die Vene in ihrer gesamten Länge mit mindestens 40 ml steriler PBS in 20-ml-Spritzen solange gespült, bis makroskopisch kein venöses Blut mehr sichtbar ist. Mit auf 37 °C erwärmter 0,05 % (w/v) Kollagenase-A-Lösung wird die überschüssige PBS ausgespült, die Nabelschnur

am dem Katheter entgegengesetzten Ende, im Folgenden das untere Ende genannt, mit einer Metallklemme abgeklemmt. Nun kann die Nabelschnurvene mit der 37 °C warmen 0,5 % (w/v) Kollagenase-A-Lösung prall gefüllt werden. Nach Abklemmung der Nabelschnur unterhalb der Wäscheklammer und Entfernung der Wäscheklammer wird der Katheter vorsichtig gezogen. Es folgt eine Inkubation der Nabelschnur in einem mit steriler PBS gefüllten Wasserbad bei 37 °C für 7 min. Abbildung 3.1 verdeutlicht die anatomischen Verhältnisse der Nabelschnur.

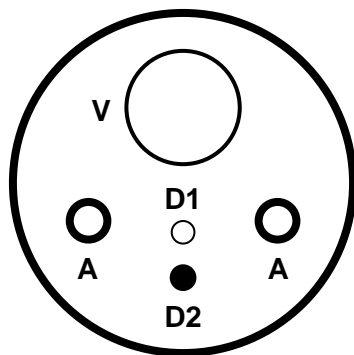


Abbildung 3.1: Schematischer Querschnitt durch die menschliche Nabelschnur.

Schematischer Querschnitt durch die menschliche Nabelschnur mit der *V. umbilicalis* (V), den beiden *Aa. umbilicales* (A) und den Resten von *Ductus allantoicus* (D1) und *Ductus omphaloentericus* (D2), die in die gallertartige Substanz der Wharton-Sulze eingebettet sind (modifiziert nach Pschyrembel 1998).

Nach der Inkubationszeit wird die Nabelschnur für ungefähr 2 min leicht massiert, um die Endothelzellverbände in der Nabelschnurvene besser lösen zu können. Anschließend wird im Abstand von 1,5 cm der unteren Metallklemme eine weitere angebracht und die Nabelschnur mit einem Skalpell zwischen diesen beiden Metallklemmen durchtrennt. Die letztangebrachte Klemme wird nun entfernt und der Inhalt der Nabelschnurvene in ein Zentrifugationsröhrchen mit Medium 199 und 10 % (v/v) FCS einlaufen lassen. Die Nabelschnurvene wird nicht ausgedrückt oder mit steriler PBS nachgespült. Im Anschluss wird die Zellsuspension bei Raumtemperatur und 1.200 rpm, etwa 150–200 g, über 10 min abzentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wird nun je nach geschätzter Zellausbeute in etwa 10 ml HUVEC-Medium aufgenommen und in Zellkulturgefäße ausgesät. Die Zellkultur wird spätestens nach einer Ruhezeit von 24 h

mikroskopisch beurteilt und nach mehreren Waschschritten mit frischem, auf 37 °C erwärmtem HUVEC-Medium versorgt. Dabei werden auch möglicherweise noch vorhandene Erythrozyten beseitigt, die durch enzymatische Auflösung von Blutkoageln in die Kultur gelangt sind. Die HUVEC befinden sich nun in der 0. Passage und können bis kurz vor Erreichen eines konfluenten, einschichtigen Zellverbandes, eines sogenannten Monolayers, vermehrt werden.

3.1.2 Kultur und Konservierung von Zellen

3.1.2.1 Beschichtungslösungen für die Kultur von humanen Endothelzellen

5,0 g Gelatine vom Typ A aus Schweinehaut werden in 1.000 ml destilliertem Wasser auf eine Temperatur zwischen 80 und 100 °C erhitzt und bis zur vollständigen Auflösung der Gelatine unter stetem Rühren auf einem beheizbaren Magnetrührgerät inkubiert. Die erhaltene 0,5 % (w/v) Gelatinelösung wird anschließend über etwa 1 h unter einem Druck von 1 bar bei einer Temperatur von 120–130 °C in einem Autoklaven sterilisiert und in praktischen Portionen zu etwa 50 ml bei Verwendung innerhalb zwei Wochen bei 4 °C im Kühlschrank oder -raum, bei Lagerung von bis zu drei Monaten bei –20 °C im Gefrierschrank oder -raum aufbewahrt.

Zur Bereitstellung von 1.000 ml 2 % (v/v) Glutardialdehydlösung werden 20 ml Glutardialdehyd in 980 ml steriler PBS gelöst und bei –20 °C eingefroren gelagert. Eine Aufbewahrung bei 4 °C länger als eine Woche wird vermieden.

3.1.2.2 Beschichtung von Zellkulturgefäßen für die Kultur von humanen Endothelzellen

Für die Kultur von HUVEC oder HBMEC sollten günstige Adhärenz- und Wachstumsbedingungen geschaffen werden, indem die Zellkulturgefäße mit Gelatinelösung alleine oder einer Kombination von Gelatinelösung und anschließender Quervernetzung der Kollagenfibrillen mittels Glutardialdehydlösung beschichtet werden. Hierbei werden

Böden von Zellkulturgefäßen aus Kunststoff zunächst mit 0,5 % (w/v) Gelatinelösung bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert. Die Böden werden dann von überschüssiger Gelatinelösung befreit und einmalig mit steriler PBS gewaschen, indem der Boden der Zellkulturgefäße für 10 min mit steriler PBS versetzt wird. Die Waschlösung kann dann mittels steriler Glaspipetten abgenommen werden. Im Anschluss können die Zellkulturgefäße bei 4 °C zwischengelagert werden.

Böden von Zellkulturgefäßen aus Glasmaterialien werden zunächst ebenfalls mit 0,5 % (w/v) Gelatinelösung behandelt. Nach Abnahme der überschüssigen Gelatinelösung werden die am Boden anhaftenden Kollagenfasern nun mittels 2 % (v/v) Glutaraldehydlösung über 30 min vernetzt. Wegen der zytotoxischen Wirkung von Glutaraldehyd werden drei Waschschriffe mit steriler PBS von je 10 min Dauer angeschlossen. Auch die so beschichteten Zellkulturgefäße können dann bei 4 °C gelagert werden.

3.1.2.3 Kultur adhärent und in Suspension wachsender Zellen

Adhärenent wachsende Zellen werden in mit Filtern ausgestatteten Zellkulturgefäßen aus Kunststoff in an die jeweilige Zellart angepasstes Zellkulturmedium mit Beimischung von FCS und Antibiotika im befeuchteten Brutschrank bei 37 °C und unter Begasung mit CO₂ zu einem Konzentrationsgemisch von 95 % (v/v) Luft und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Nach Vermehrung und vor Ausbildung eines vollständig konfluenten Zellrasens werden die Zellen nach einem Waschschriff mittels etwa 1 ml, möglichst 37 °C warmer ATV-Lösung pro 50 cm² Kulturoberfläche gelöst, mit Zellkulturmedium versetzt und nach Bedarf im Verhältnis von etwa 1:5 bis 1:10 wieder in neue Zellkulturgefäße ausgesät. Das Zellkulturmedium wird alle 2–3 d abgezogen und durch frisches ersetzt.

Als Zellkulturmedien für die adhärenent wachsenden, nichtendothelialen Zellarten kommen folgende Zusammensetzungen zum Einsatz: für B95a-Zellen RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS und 200 mM L-Glutamin, für Vero-Zellen NaHCO₃-gepuffertes MEM mit 5 % (v/v) FCS und 200 mM L-Glutamin, für HeLa-Zellen NaHCO₃-gepuffertes MEM mit 10 % (v/v) FCS und 200 mM L-Glutamin und für CHO-K1-Zellen und deren Abkömmlinge NaHCO₃-gepuffertes MEM mit 5 % (v/v) FCS und 200 mM L-Glutamin. Zur Verringerung des Risikos der Kontamination der Kulturen mit Bakterien wird eine

Antibiotikakombination von Penicillin und Streptomycin mit einer Endkonzentration von je etwa 240 µg/ml im Medium verwendet.

Die Kultur endothelialer Zellen erfordert im Gegensatz dazu höhere Ansprüche an die Kulturgefäße und die Zusammensetzung des Nährmediums. Die Böden der Kulturgefäße werden hierbei zur verbesserten Zelladhärenz vorbeschichtet. Für die Kultur von HUVEC wird als Grundnährmedium Medium 199 mit Earle-Salzen, 2 mM L-Glutamin und 25 mM HEPES verwendet. Eine Anreicherung findet mit 20 % (v/v) FCS, 5 U/ml Heparin, 30 µg/ml ECGS und der schon genannten Antibiotikakombination statt. Für die Kultur von HBMEC wird RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und GlutaMAX™ I mit 10 % (v/v) FCS, 10 % (v/v) NuSerum™ IV, 1 % (v/v) MEM non-essential amino acids 100x, 1 % (v/v) vitamin solution 100x, 1 mM Natriumpyruvat, 5 U/ml Heparin, 30 µg/ml ECGS und ebenfalls der Antibiotikakombination angereichert. Es werden nur HUVEC in der 0. und 1. Passage, gelegentlich in der 2. Passage, und HBMEC zwischen der 16. und 20. Passage eingesetzt.

BJAB-Zellen als Vertreter von Suspensionszellen werden ebenfalls in mit Filtern ausgestatteten Zellkulturgefäßen aus Kunststoff in RPMI 1640 mit 2 mM L-Glutamin und zusätzlich 10 % (v/v) FCS und der schon beschriebenen Antibiotikakombination im befeuchteten Brutschrank bei 37 °C und unter Begasung mit CO₂ zu einem Konzentrationsgemisch von 95 % (v/v) Luft und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Erreichen die Zellen in der Suspensionskultur eine Dichte, die eine weitere Zellvermehrung erschwert, werden die Zellen je nach Bedarf im Verhältnis von etwa 1:5 bis 1:10 wieder in neue Zellkulturgefäße überführt und mit entsprechendem Zellkulturmedium versetzt. Ist eine solche Zelldichte noch nicht erreicht, wird dem Zellkulturgefaß frisches Medium hinzugegeben. Für die Produktion größerer Zellmengen wird die jeweilige Zellsuspension in Rollerkulturflaschen unter kontinuierlichem Rollen im Brutraum bei 37 °C inkubiert. Um eine höhere Pufferkapazität des Zellkulturmediums bei hier fehlender CO₂-Begasung zu erreichen, wird dem Zellkulturmedium 25 mM HEPES zugesetzt.

Um die kultivierten Zellen vor den Komplementfaktoren und kreuzreagierenden Antikörpern zu schützen, wird das FCS vor seiner Verwendung für 30 min bei 60 °C inaktiviert und erneut zur Abkühlung gebracht. Nun ist das inaktivierte FCS bei einer Lagertemperatur von 4 °C zur Anreicherung von Nährmedien verwendbar.

3.1.2.4 Kultur von Hybridomzellen zur Antikörpergewinnung

Hybridomzellen, die durch die Fusion von Antikörper produzierenden Zellen mit den immortalisierten, murinen Myelomzellen SP2/0 entstanden sind, werden in RPMI 1640 mit L-Glutamin mit 10 % (v/v) FCS als leicht adhärenente Zellen im befeuchteten Brutschrank bei 37 °C und unter Begasung mit CO₂ zu einem Konzentrationsgemisch von 95 % (v/v) Luft und 5 % (v/v) CO₂ inkubiert. Bei Erreichen eines recht konfluenten Zellrasens wird das überstehende Nährmedium regelmäßig gegen frisches ausgetauscht. Das entfernte Nährmedium dient dabei als Ausgangslösung zur Aufreinigung und Konzentrierung des monoklonalen Antikörpers. Zur Teilung der Zellkultur reicht es aus, den Boden der Zellkulturflasche mit Nährmedium zu spülen, um die erhaltene Zellsuspension zu teilen und neu auszusäen.

3.1.2.5 Zellzählung

Zellen werden vor ihrer Verwendung für Experimente gezählt. Hierfür wird ein Hämozytometer in Form einer Zählkammer mit einer Einteilung nach Neubauer benutzt. Adhärenent wachsende Zellen werden zunächst gelöst und in eine homogene Suspension versetzt. In Suspension wachsende Zellen werden ebenfalls durch vorsichtiges Schütteln in eine homogene Suspension überführt.

Sollen bereits abgestorbene Zellen nicht in die Zählung eingehen, werden 100 µl einer solchen Zellsuspension mit einem gleichen Volumen 0,4 % (w/v) Trypanblaulösung versetzt und resuspendiert. Die Zelldichte ergibt sich nun aus der Multiplikation der ausgezählten Zellen eines der neun Quadrate der Zählkammer nach Neubauer mit dem Faktor $2 \cdot 10^4$ und beschreibt die Zellzahl je µl. Blau gefärbte Zellen werden nicht in die Zählung eingeschlossen. Die Zählvorgänge werden mindestens zweimalig separat durchgeführt. Natürlich kann nun auf die Gesamtzellzahl in der ursprünglichen Suspension zurückgerechnet werden, indem die ermittelte Zelldichte mit dem Volumen der ursprünglichen Zellsuspension multipliziert wird.

3.1.2.6 Kryokonservierung von Zellen

Zellen können durch Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff gelagert und nach dem Auftauen wieder zur Kultur verwendet werden. Dafür werden etwa $2 \cdot 10^6$ adhären wachsende nach Ablösung und $1 \cdot 10^7$ in Suspension wachsende Zellen in Suspension für 10 min bei 1.200 rpm, etwa 200 g, und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand durch Dekantierung verworfen und das Zellpellet in 2 ml 4 °C kaltem Einfriermedium, bestehend aus FCS mit 10 % (v/v) DMSO, resuspendiert. Anschließend werden je 1 ml der Zellsuspension in auf –20 °C vorgekühlte Kryokonservierungsröhrchen überführt. Um eine Abkühlung der Zellsuspension um etwa 1 °C pro Minute zu erreichen, wird das Kryokonservierungsröhrchen in einem Styroporbehälter zunächst für 2 h im Gefrierschrank bei –20 °C, anschließend für weitere 10 h im Gefrierschrank bei –80 °C zwischengelagert, bevor es in flüssigem Stickstoff für einen längeren Zeitraum gelagert werden kann.

Zum Auftauen der Zellen wird das Kryokonservierungsröhrchen mit der Zellsuspension in ein auf 37 °C vorgewärmtes Wasserbad getaucht und unmittelbar nach Auftauen der gefrorenen Zellsuspension mit 70 % (v/v) Ethanol zügig abgewischt. Zum vollständigen Auftauen der Zellsuspension wird der Inhalt des Röhrchens in 9 ml, auf 37 °C vorgewärmtes Zellkulturmedium überführt. Zur weiteren Verdünnung des Einfriermediums erfolgt nun rasch die Zentrifugation der Zellsuspension für 10 min bei etwa 1.200 rpm, etwa 200 g, um toxische Effekte des Einfriermediums, speziell des Zellstabilisators DMSO, auf die Zellen zu minimieren. Das Zellpellet wird dann in frisches Kulturmedium aufgenommen. Nach Aussäen der Suspension der adhären wachsenden Zellen werden die Zellkulturgefäße wie üblich inkubiert und nach erfolgter Anheftung der Zellen an die Oberfläche spätestens 24 h nach Entfernen des Zellkulturmediums mit frischem Zellkulturmedium versorgt. Die Zellen werden zuvor in ihrer Vitalität und Morphologie beurteilt. Das Wachstumsverhalten der Zellen ist nun abhängig von der Zellart, der eingefrorenen Charge und der Qualität des Einfrier- und Auftauvorgangs.

3.1.2.7 Mykoplasmentestung

Prinzipiell werden Zellkulturen täglich auf ihr Wachstumsverhalten und ihre Morphologie beurteilt. Kontaminationen der Zellkultur mit Bakterien, Pilzen und Hefen können so in ausreichendem Maße frühzeitig mikroskopisch eindeutig erkannt werden. Eine Kontamination der Zellkultur mit Mykoplasmen, die sich intrazellulär in Vakuolen vermehren, ist mikroskopisch nicht oder nur sehr schwer indirekt zu erkennen. Im Verdachtsfall wird die Zellkultur unmittelbar verworfen und durch eine neu aufgetaute Charge ersetzt. Regelmäßig, in jedem Fall vor jedem Einfriervorgang, werden Zellkulturen auf eine Kontamination mit Mykoplasmen untersucht. Dazu wird die Zellkultur für 3 d im jeweiligen Zellkulturmedium mit FCS ohne die Zweifachkombination Penicillin und Streptomycin inkubiert. Der Nachweis einer Verunreinigung erfolgt dann aus dem zellfreien Überstand über die Bestimmung von Mykoplasmen-DNA mittels eines Mykoplasmen-PCR-Detektions-Kits. Ist der Mykoplasmenachweis positiv, wird die Kultur durch eine nichtkontaminierte Charge ersetzt. Auf eine mykoplasmenspezifische antibiotische Therapie konnte allerdings im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit verzichtet werden.

3.2 Histo- und zytochemische Methoden

3.2.1 Herstellung der Eindecklösung

Grundsubstanz für die Eindecklösung für die Phasenkontrast- und Immunfluoreszenzmikroskopie ist MOWIOL[®] 4-88. In einem Erlenmeyerkolben werden 2,4 g MOWIOL[®] 4-88 und 6,0 g Glycerin gemischt, vorsichtig unter stetem Rühren mit 6,0 ml *aqua dest.* versetzt und für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Parallel werden 2,42 g Tris-Base in etwa 80 ml *aqua dest.* gelöst, die Lösung mit HCl-Maßlösung 1 M auf pH 8,5 titriert und mit *aqua dest.* auf 100 ml einer 0,2 M Tris-HCl-Lösung mit pH 8,5 aufgefüllt. Nach der Inkubationszeit wird der Ansatz um 12 ml der 0,2 M Tris-HCl-Lösung mit pH 8,5 ergänzt und unter weiterhin stetem Rühren für etwa 15 min nun bei 50 °C auf dem

Magnetheizrührer inkubiert. Nach dem Lösen der Substanzen folgt ein Zentrifugationsschritt in der Standzentrifuge J2-MC mit dem Rotor JA-20 für 15 min bei 6.400 rpm, etwa 3.200 g, und 20 °C, um eventuell nicht gelöste Bestandteile zu entfernen. Nun werden 18 ml des Überstandes vorsichtig in ein 50-ml-Zentrifugenröhrchen überführt, mit 0,45 g DABCO zu einer Endkonzentration von 2,5 % (w/v) versetzt und kurz bei 37 °C im Wasserbad in Lösung gebracht. Anschließend kann die Eindecklösung portioniert und bei –20 °C gelagert werden.

3.2.2 Durchflusszytometrie

Durchflusszytometrische Analysen werden mit dem Durchflusszytometer FACScan™ von Becton Dickinson unter Verwendung der Software Lysis II™ durchgeführt. Die so erhaltenen Rohdaten werden anschließend mit der Software CellQuest™ ausgewertet.

Im Hinblick auf den Ablauf der Immunfluoreszenzfärbungen wird hier zwischen Oberflächen- und Intrazellulärfärbungen und zwischen Einfach- und Doppelfärbungen mit oder ohne Gegenfärbung der nichtvitalen Zellen unterschieden. Grundsätzlich wird folgendes Protokoll angewendet. Adhärent wachsende Zellarten werden zunächst mit PBS⁽⁻⁾ zweimalig gewaschen und mit HBSS⁽⁻⁾ und 1 mM EDTA in eine Zellsuspension überführt. Ein ähnliches Vorgehen verlangen Suspensionszellen, die mehrfach für 10 min bei 1.200 rpm, etwa 200 g, bei 4 °C mit PBS⁽⁻⁾ gewaschen werden. Die Volumina der Lösungen werden den Wachstumsflächen oder Suspensionsvolumina entsprechend angepasst.

Sodann werden $2-5 \cdot 10^4$ Zellen in einem Volumen von 200 µl in ein spezielles, für das Durchflusszytometer ausgelegtes Röhrchen pipettiert. Die Anzahl der Röhrchen richtet sich dabei nach der Anzahl der unterschiedlichen Messungen. Zunächst werden die Röhrchen für 10 min bei 1.200 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand mit einer unter Vakuum stehenden Pasteurpipette verworfen. Nun wird das Pellet in 100 µl 3,7 % (v/v) Paraformaldehyd in PBS⁽⁻⁾ aufgenommen, resuspendiert und die Zellen für 7–10 min auf Eis fixiert. Anschließend werden die Zellsuspensionen mit jeweils 1 ml FACS-Puffer gewaschen, was ein erneutes Zentrifugieren und Verwerfen des Überstandes beinhaltet. Für intrazelluläre Färbungen werden die fixierten Zellen nun mit je

100 µl Triton X-100 0,25 % (v/v) in PBS⁽⁻⁾ permeabilisiert, wieder für 10 min auf Eis inkubiert und erneut mit 1 ml FACS-Puffer gewaschen.

Zur Vorbereitung der Immunfärbungen werden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit jeweils 1 ml RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS über 30 min auf Eis oder über Nacht im Kühlschrank blockiert, bevor sich ein Waschschrift mit 1 ml FACS-Puffer anschließt. Nun folgt die Inkubation der Zellen mit dem Primärantikörper oder dem biotinylierten Lektin in einer zuvor kontrollierten und angepassten Verdünnungsstufe von etwa 1:100 bis 1:50 in einem Volumen von 75–100 µl für etwa 45 min auf Eis. Nach mindestens zwei Waschschriften mit 1 ml FACS-Puffer können die Zellen mit einem fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Sekundärantikörper, meistens mit dem polyklonalen FITC-konjugierten Anti-Maus-IgG-Antikörper, in einer Verdünnungsstufe von 1:100 oder mit dem fluoreszenzfarbstoffgekoppeltem Streptavidin in einem Volumen von 75–100 µl für 45 min in lichtgeschützter Umgebung im Kühlschrank inkubiert werden. Nach mindestens zwei erneuten Waschschriften mit 1 ml FACS-Puffer werden die Zellpellets in jeweils 50–300 µl FACS-Puffer aufgenommen und resuspendiert.

Um nichtvitale Zellen durchflusszytometrisch auszuschließen, können die Pellets in 25 µl einer Propidiumiodidlösung in einer Endkonzentration von 1 µg/ml zur Gegenfärbung aufgenommen und dann während der Messphase nicht berücksichtigt werden. Abweichend vom Protokoll der Einfachfärbungen werden Oberflächendoppelfärbungen zum Nachweis einer Masernvirusinfektion und der Masernvirusrezeptorexpression mit dem direktmarkierten, MV-H-spezifischen Antikörper K4 durchgeführt. Für die Detektion der CD46- und SLAM-spezifischen Primärantikörper 13/42 und 5C6 wird ein RPE-gekoppelter Sekundärantikörper zur Vermeidung von Kreuzreaktionen verwendet. Dabei wird im Rahmen des Protokolls nach der Färbung mit den Primär- und Sekundärantikörpern vor Zugabe des direktmarkierten Antikörpers ein Blockierschritt mit murinem Serum vorgenommen.

Nach Abschluss der direkten oder indirekten Immunfluoreszenzfärbungen wird die durchflusszytometrische Analyse zügig vorgenommen. Dabei wird nach Ausgrenzung morphologisch toter und propidiumiodidpositiver Zellen die Fluoreszenzintensität von $5 \cdot 10^3$ bis $1 \cdot 10^4$ Zellen gemessen und gegenüber der Negativkontrolle eines nicht bindenden, isotypen Antikörpers analysiert.

3.2.3 Indirekte Immunfluoreszenzmikroskopie

Für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen stehen mit dem Lab-Tek[®]-II-Chamber-Slide[™]-System Kammerobjektträger aus UV-durchlässigem Kunststoff zur Verfügung. Adhärent wachsende Zellen werden dabei in Kammern direkt auf dem Objektträger kultiviert und je nach Versuchsanordnung infiziert und immungefärbt.

Für die indirekte Immunfluoreszenzfärbung wird das Nährmedium mittels einer unter einem schwachen Vakuum stehenden Pasteurpipette vorsichtig abgezogen und der Zellmonolayer zweimal vorsichtig mit 200 µl PBS gewaschen. Im weiteren Verlauf werden die Arbeitsschritte auf Eis und mit anschließenden, mindestens einmaligen Waschschritten mit 400 µl PBS für 2 min vorgenommen, Inkubationen werden im Kühlschrank bei 4 °C durchgeführt. Einem Fixierungsschritt mit 3,7 % (w/v) Paraformaldehydlösung in PBS für etwa 7–10 min folgt die Permeabilisierung der Zellen mit 0,25 % (v/v) Triton X-100 in PBS für 10 min. Anschließend werden unspezifische Antikörperbindungsstellen mit 400 µl kaltem MEM und 10 % (v/v) FCS über 1 h blockiert. Nun werden die Zellen mit der Verdünnung des Primärantikörpers oder des Ulex-europaeus-Agglutinins I für 1 h und danach mit der Verdünnung des Sekundärantikörpers oder des farbstoffgekoppelten Streptavidins für 1 h inkubiert. Zur verbesserten und verlängerten Fluoreszenzintensität wird der rotes oder grünes Licht emittierende Farbstoff Alexa Fluor[®] in einer Verdünnung von 1:400 gewählt, zur Visualisierung der Zellkerne wird der blaues Licht emittierende, DNA-interkalierende Farbstoff DAPI in einer Verdünnung von 1:300 bis 1:1.000 eingesetzt.

Nach mehrmaligen Waschschritten mit 400 µl PBS kann nun der Kammeraufsatz entfernt, der Objektträger kurz getrocknet und mit wenigen Tropfen der angesetzten Eindecklösung MOWIOL[®] 4-88 überschichtet werden. Das aufgesetzte Deckglas wird gegebenenfalls mit handelsüblichem Nagellack nach außen hin versiegelt. Die immunfluoreszenzmikroskopische Auswertung wird nun mit dem Fluoreszenzmikroskop Aristoplan und der Digitalkameraeinheit DC 300F durchgeführt und dokumentiert. Es stehen dabei mehrere Objektive, darunter ein Ölimmersionsobjektiv 100x, und mehrere Filter zur Verfügung.

3.3 Virologische Methoden

3.3.1 Amplifikation attenuierter Masernvirusstämme

Zur Amplifikation attenuierter Masernvirusstämme, hier als einzigen Vertreter Edm, werden Vero-Zellen in 175-cm²-Zellkulturflaschen bis zur Ausbildung eines Monolayers mit einer Dichte von etwa 80 % kultiviert und nach Entfernung des Nährmediums mit etwa 5 ml serumfreiem Nährmedium versetzt. Anschließend wird die Kultur mit dem Masernvirusstamm Edm mit einer MOI von 0,01 inokuliert und für 60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wird das Nährmedium abgezogen und durch 15 ml des serumhaltigen Nährmediums ersetzt. Die Zellkultur wird nun bis zum Erreichen des maximalen zytopathischen Effekts noch vor der Lyse der infizierten Zellen über einen Zeitraum von etwa 3–5 d im Brutschrank bei 33 °C inkubiert. Dann wird das Medium abgezogen und mit 2–4 ml serumfreiem Nährmedium ersetzt, so dass der Zellmonolayer gerade noch benetzt ist, und die Zellkulturflasche über Nacht bei –80 °C eingefroren. Am darauf folgenden Tag wird der Zellmonolayer bei 4 °C langsam zum Auftauen gebracht, das zellgebundene Masernvirus mit Hilfe eines Zellschabers und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren freigesetzt. Nun wird das Zelldebris für 15 min bei 4.000 rpm, etwa 2.000 g, und 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in Kryokonservierungsröhrchen aliquottiert und bei –80 °C verwahrt.

Gleichzeitig zu dieser Viruspräparation werden Vero-Zellen bis auf den Schritt der Infektion mit dem Masernvirusstamm exakt gleich behandelt. Man erhält einen Überstand, der als negative Kontrolle für Infektionsversuche genutzt werden kann und als Mockpräparation bezeichnet wird.

3.3.2 Amplifikation virulenter Masernvirusstämme

Zur Amplifikation der übrigen virulenten Masernvirusstämme werden $1 \cdot 10^7$ bis $1 \cdot 10^8$ BJAB-Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 1.200 rpm und Raumtemperatur pelletiert, in 2–3 ml serumfreies Nährmedium aufgenommen und resuspendiert. Daraufhin wird die Zellsuspension mit dem zu amplifizierenden Masernvirusstamm mit einer

MOI von 0,01 inokuliert und für 60 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wird der infizierten Zellsuspension 25 ml serumhaltiges Nährmedium hinzugegeben und bis zum Erreichen des maximalen zytopathischen Effekts noch vor der Lyse der infizierten Zellen für etwa 3–5 d im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Nach Bedarf kann in diesem Zeitraum serumhaltiges Nährmedium hinzugegeben werden. Zum Zeitpunkt des maximalen zytopathischen Effekts wird die infizierte Zellsuspension für 10 min bei 1.200 rpm und Raumtemperatur abzentrifugiert und als Inokulum für eine tags zuvor mit frischem RPMI 1640 mit L-Glutamin und 25 mM HEPES gleichen Volumens versetzte Suspensionskultur nichtinfizierter BJAB-Zellen in Rollerkulturflaschen verwendet.

Unter stetem Rollen auf einer Rollapparatur wird die infizierte Suspensionskultur im Brutraum bei 37 °C und einem Volumen von etwa 1.200 ml weiter inkubiert und bei Erreichen des maximalen zytopathischen Effekts vor Lyse der infizierten Zellen durch Zentrifugation für 10 min bei 1.200 rpm und 4 °C pelletiert. Nach Resuspendierung des Pellets in 5 ml, 4 °C kaltem, serumfreiem RPMI 1640 wird ein Einfriervorgang bei –80 °C über Nacht angeschlossen. Am darauf folgenden Tag wird das zellgebundene Masernvirus durch langsames Auftauen der Suspension bei 4 °C und vorsichtiges Auf- und Abpipettieren freigesetzt. Sodann wird das Zelldebris für 15 min bei 4.000 rpm, etwa 2.000 g, und 4 °C abzentrifugiert, der Überstand in Kryokonservierungsröhrchen aliquottiert und bei –80 °C verwahrt.

Gleichzeitig zu dieser Viruspräparation werden BJAB-Zellen bis auf den Schritt der Infektion mit dem Masernvirusstamm auch hier exakt gleich behandelt. Man erhält einen Überstand, der als negative Kontrolle für Infektionsversuche genutzt werden kann und als Mockpräparation bezeichnet wird.

3.3.3 Virustiterbestimmung mittels Plaquetitration

Der Plaquetest erlaubt eine recht genaue Berechnung des Titers infektiöser Viruspartikel in der Virusstammlösung. Da sich die sehr gut adhärierenden Vero-Zellen wegen ihrer Rezeptorausstattung nur für die Titerbestimmung von Masernvirusimpfstämmen eignen und die für Masernviruswildtypstämme einsetzbaren B95a-Zellen sich sehr leicht bei

ihrer Überschichtung ablösen, kann der Plaquetest nur zur Quantifizierung des Titers von Edm verwendet werden.

Zur Durchführung des Tests werden $1 \cdot 10^6$ Vero-Zellen in eine 6-Well-Zellkulturplatte ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C zur Adhäsion gebracht. Am darauf folgenden Tag werden Verdünnungsreihen von jeweils 1:10 von der zu untersuchenden Virusstammlösung bei 4 °C angefertigt und je 1 ml davon auf einen fast konfluierenden Vero-Zellmonolayer der 6-Well-Zellkulturplatte überführt, von dem zuvor das Nährmedium vollständig abgezogen worden ist. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C wird das virushaltige Nährmedium abpipettiert, der Zellmonolayer zweimal mit serumfreiem Nährmedium bei 37 °C gewaschen und vorsichtig mit 40 °C temperiertem Overlay-Agar überschichtet. Nach dem Erstarren des Overlay-Agars bei Raumtemperatur werden die überschichteten, infizierten Zellmonolayer für einige Tage bis zur Ausbildung deutlicher Infektionsfoci, die durch den zytopathischen Effekt des Virus im Zellmonolayer entstehen, bei 37 °C inkubiert und anschließend mit 1 ml 1:100 in PBS verdünnter Neutralrotlösung 1,6 % (w/v) für 60 min gefärbt. Hiernach wird die überschüssige Neutralrotlösung verworfen, die Zellkulturplatte im Brutschrank bei 37 °C verwahrt und nach 24–48 h hinsichtlich der Ausbildung von Plaques beurteilt, die sich als ungefärbte Areale gegenüber der gefärbten Umgebung abgrenzen lassen. Es wird die Verdünnungsstufe zur Auszählung der Plaques verwendet, die keine Interferenzen zwischen verschiedenen Plaques bietet. Die Anzahl der Plaques gibt den reziproken Wert der infektiösen Partikel in 1 ml der Virusstammlösung wieder.

3.3.4 Virustiterbestimmung mittels Endpunkttitration

Die Konzentration infektiöser Partikel in Präparationen der Masernvirusstämme Edm, WTFb, Wü4797, Wü5679 und Wü7671 wird mittels Endpunkttitration bestimmt. Dazu werden $3-5 \cdot 10^4$ Vero-Zellen zur Titerbestimmung von Edm und $3-5 \cdot 10^4$ B95a-Zellen zur Titerbestimmung der übrigen Masernvirusstämme in 48-Well-Zellkulturplatten mit jeweils 400 µl Nährmedium mit 5 % (v/v) FCS ausplattiert, über Nacht im Brutschrank bei 37 °C zur Adhäsion gebracht und am darauf folgenden Tag mit bei 4 °C angesetzten Verdünnungsreihen von je 1:4 des Virusinokulums beimpft. Nach einer Inkubationszeit

von etwa 5 d und täglicher lichtmikroskopischer Beurteilung wird aus mindestens drei Ansätzen die Verdünnungsstufe als Basis für die Auswertung verwendet, die eben noch zu einer deutlichen Infektion mit zytopathischem Effekt in der Zellkultur führt. Die Titerangabe erfolgt nun, äquivalent zum Plaquetest, in pfu/ml.

B95a-Zellen eignen sich wegen ihrer Permissivität für virulente Masernvirusstämme und gleichzeitig wegen ihres adhärenenten Wachstumsverhaltens sehr gut zur Titerbestimmung mit diesem Verfahren. In der Vergangenheit hat sich kein Unterschied zwischen Titerbestimmungen mit durchflusszytometrisch geführtem Nachweis einer Infektion von BJAB-Zellen und mit lichtmikroskopisch erkennbarem zytopathischem Effekt bei B95a-Zellen ergeben.

3.3.5 Virusbindungsassay

Für das Virusbindungsassay werden adhärente Zellen zunächst mit 37 °C warmem PBS⁽⁻⁾ zweimalig gewaschen und mit HBSS⁽⁻⁾ und 1 mM EDTA in eine Zellsuspension überführt. Ein ähnliches Vorgehen verlangen Suspensionszellen, die mehrfach für 10 min bei 1.200 rpm, etwa 200 g, bei Raumtemperatur mit PBS⁽⁻⁾ gewaschen werden. Daraufhin werden $5 \cdot 10^4$ Zellen in einem Durchflusszytometerröhrchen mit attenuierten und virulenten Masernvirusstämmen bei verschiedenen MOI, innerhalb einer MOI mit vergleichbaren Hämagglutininmengen, für 1 h bei 4 oder 37 °C inkubiert. Im Anschluss wird die Menge an gebundenem Hämagglutininprotein mittels der MV-H-spezifischen Primärantikörper K83 oder L77 in einer Verdünnung von 1:50 bis 1:100 als fixierte Einfachfärbung durchflusszytometrisch bestimmt. Dabei wird die relative Virusbindung angegeben, indem der Durchschnitt der Fluoreszenzintensität der virushaltigen Proben als Vielfaches des Durchschnitts der Fluoreszenzintensität der Kontrollprobe mit der jeweiligen Mockpräparation berechnet wird.

3.3.6 Infektions- und Infektionsinhibitionsassay

Für das Infektionsassay werden $2 \cdot 10^4$ bis $2 \cdot 10^6$ Zellen mit verschiedenen Masernvirusstämmen und Mockpräparationen bei einer MOI von 0,01–0,5 für 1 h bei 37 °C in

einem geringen Volumen in serumfreiem Nährmedium inkubiert, anschließend mit serumhaltigem Medium gewaschen und für eine je nach Versuchsanordnung festgesetzte Dauer bebrütet. Die Zellen werden mindestens zweimal täglich auf ihre Beschaffenheit kontrolliert. Zur Messung des Infektionsausmaßes kann nun die Expression von MV-H an der Zelloberfläche durchflusszytometrisch gemessen oder die Produktion von MV-N im Zytoplasma durch die Immunfluoreszenzmikroskopie detektiert und visualisiert werden.

Der Ablauf des Infektionsinhibitionsassays unterscheidet sich durch die Vorinkubation der zu infizierenden Zellen mit einem Antikörper, der die rezeptorvermittelte Aufnahme von Masernviren selektiv hemmt. Zum Einsatz kommt hierbei der CD46-spezifische, monoklonale Antikörper B97 in verschiedenen Konzentrationen. Nun wird die Detektion von intrazellulären Masernvirusproteinen und damit der Infektion durch die Immunfluoreszenzmikroskopie mittels eines humanen Hyperimmunserums eines an SSPE Erkrankten und des FITC-gekoppelten, gegen humane Immunglobuline gerichteten Sekundärantikörpers vorgenommen.

3.3.7 Quantifizierung der Masernvirusreplikation

Mit der Methode der Endpunkttitration kann das Ausmaß der Replikation von Masernviren in einer Zellkultur mit definierter Zellzahl und definiertem Kulturvolumen analysiert werden. Dazu werden $1 \cdot 10^5$ Zellen in 12-Well-Zellkulturplatten überführt und im jeweiligen Zellkulturmedium bis zur vollständigen Adhärenz inkubiert. Nach Infektion der Zellen mit verschiedenen Masernvirusstämmen bei einer MOI von 0,1 werden die infizierten Zellkulturen in 1 ml des jeweiligen Zellkulturmediums mit FCS 5 % (v/v) über 7 d bebrütet, um bei der Quantifizierung der Masernvirustiter schließlich Störeinflüsse durch die differierenden Konzentrationen von FCS zu vermeiden. Zur Bestimmung der Masernvirustiter werden die Zellkulturplatten bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ eingefroren und am nächsten Tag bei $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ langsam aufgetaut. Das zellgebundene Virus wird mit Hilfe eines Zellschabers und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren freigesetzt. Nun wird das Zelldebris für 15 min bei 4.000 rpm, etwa 2.000 g, und $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ abzentrifugiert, der Über-

stand in Kryokonservierungsröhrchen aliquottiert und bei $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Gefrierschrank bis zur zeitnahen Virustiterbestimmung durch die Endpunkttitration verwahrt.

3.3.8 Inaktivierung von Masernviren

Masernviren können unter Einwirkung von Ultraviolettlicht inaktiviert werden. Hierzu wird 1,0 ml der Masernviruslösung in eine kleine Petrischale von 35 mm Durchmesser pipettiert. Die Inaktivierung wird nun bei $1,5\text{ J/cm}^2$ für 30 min bei geöffnetem Deckel unter Ultraviolettlicht vorgenommen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wird mit dem Bicinchoninsäuretest durchgeführt. Dieser Test nutzt die Reduktion von zweiwertigem zu einwertigem Kupfer durch die Anwesenheit von Proteinen. Die einwertigen Kupferionen werden dann durch Bicinchoninsäure in violetten Komplexen gebunden, deren maximale Absorption bei 562 nm liegt und gegenüber einer Proteinstandardlösung photometrisch gemessen werden kann. Dabei verhält sich der Absorptionsgrad direkt proportional zur Proteinkonzentration.

Für die Durchführung des Tests werden 50 μl der zu messenden Probe mit 2,0 ml einer Verdünnung von 1:50 Kupfer-II-Sulfat-Lösung in Biconchoninsäure versetzt, gemischt, für 30 min bei $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ im Wasserbad inkubiert und anschließend auf Eis abgekühlt. In einer Kunststoffküvette wird nun die Absorption bei 562 nm gegenüber zwei Eichlösungen photometrisch bestimmt Als Nullwert wird ein Ansatz mit 50 μl PBS anstatt der zu messenden Probe hergestellt. Von einer Proteinstandardlösung mit einer definierten Proteinkonzentration werden 10 μl in einem Ansatz photometrisch gemessen und als weiterer Eichwert verwendet. Mit dem vorhandenen Photometer können die ent-

sprechenden Parameter eingegeben und automatisch die Proteinkonzentrationen in den Proben berechnet werden.

3.4.2 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern

Die antikörperhaltigen Überstände der Hybridomzellkultur werden auf 4 °C abgekühlt und gelagert. Ist ein Gesamtvolumen von mindestens 500 ml erreicht, werden die Überstände für 15 min bei 6.000 rpm, etwa 4.500 g, und 4 °C zentrifugiert, um noch vorhandene Zellen und Zellbruchstücke zu pelletieren. Diese Überstände werden mittels eines Membranfilters mit 0,2 µm Porengröße sterilfiltriert. Zur Reinigung wird die Methode der Säulenchromatographie gewählt. Dazu wird der sterilfiltrierte Überstand im Kühlraum bei 4 °C über Nacht zirkulär über eine Protein-G-Sepharose-Säule gepumpt, die zuvor noch einmal mit Waschpuffer A gespült und gereinigt worden ist. Am Morgen darauf folgen die weiteren Schritte. Zunächst wird die Protein-G-Sepharose-Säule mit Waschpuffer A gespült. Anschließend werden die an Protein G gebundenen Antikörper in einem sauren Elutionspuffer bei einem pH von 2,7 gelöst und in Röhrchen mit jeweils 0,5 ml vorgelegter basischer Tris-Lösung mit einem pH von 11 aufgefangen. Die erhaltene Antikörperlösung wird nun über Nacht in Dialyseschläuche überführt und über Nacht gegen 5 l PBS dialysiert. Nach geeigneter Aliquotierung kann nun die antikörperenthaltende Lösung bei -20 °C aufbewahrt werden. Die Quantität und Qualität der Antikörpergewinnung wird dann über die photometrische Messung der Proteinkonzentration und über die Durchflusszytometrie gemessen.

3.4.3 Direktmarkierung eines monoklonalen Antikörpers

Zur Durchführung von Immunfluoreszenzdoppelfärbungen für die Durchflusszytometrie wurde der MV-H-spezifische, monoklonale Antikörper K4 mit dem Fluoreszenzfarbstoff Alexa Fluor[®] 488 mit Hilfe des Alexa Fluor[®] 488 Monoclonal Antibody Labeling Kits nach Anleitung des Herstellers direktmarkiert.

3.4.4 Herstellung von Zelllysaten

Um spezifische exprimierte und translatierte Proteine mittels der Western-Blot-Analyse zu detektieren, muß zunächst ein proteinhaltiges Lysat der zu untersuchenden Zellen hergestellt werden, um das Proteingemisch dann in der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese auftrennen zu können, bevor in der Western-Blot-Analyse Proteine mit einem antikörperspezifischen Epitop visualisiert werden können. Hierzu werden adhärente Zellmonolayer in 75 cm² großen Zellkulturflaschen zunächst zweimal mit etwa 7,5 ml PBS⁽⁻⁾ gewaschen und mit etwa 10 ml HBSS⁽⁻⁾ und 1 mM EDTA, unterstützt durch vorsichtiges Abspülen des Bodens, in eine Zellsuspension überführt. In Suspension wachsende Zellen werden für 5 min bei 1.200 rpm, etwa 150–200 g, und 4 °C abzentrifugiert und in etwa 10 ml PBS⁽⁻⁾, möglich ist auch PBS, aufgenommen.

Adhärenz und in Suspension wachsende Zellen werden nun in gleicher Weise behandelt. Es werden mindestens zwei weitere Zentrifugations- und Waschschrte mit PBS⁽⁻⁾ durchgeführt. Vor dem letzten Zentrifugationsschritt wird die Zellzahl ermittelt, woraufhin etwa $1 \cdot 10^7$ Zellen in einem letzten Zentrifugationsschritt pelletiert, in 300 µl Lysispuffer aufgenommen und für 30 min auf Eis inkubiert werden. Nach dem Schritt der Lysierung können die Zellkerne für 30 min bei 12.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert werden. Der proteinhaltige Überstand kann nun bei –80 °C gelagert und für die weiteren Schritte verwendet werden.

3.4.5 Gelelektrophorese von Proteinen

Die Gelelektrophorese dient zur Auftrennung und Aufkonzentrierung des durch Zellyse erhaltenen Proteingemischs und damit als Grundlage für die anschließende Western-Blot-Analyse. Die 1970 beschriebene Methode der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese nutzt hierbei verschiedene Besonderheiten (Laemmli 1970). Eingebettet in eine Polyacrylamidmatrix werden die Proteine durch die Präsenz von Natriumdodecylsulfat zylindrisch aufgefaltet, von einer negativ geladenen Hülle umgeben und elektrophoretisch nach ihrer linearen Größe aufgetrennt. Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems erlaubt eine Aufkonzentration verschiedener Proben an der Grenze

zwischen einem Sammel- und einem Trenngel, die sich durch verschiedene pH-Werte unterscheiden und in denen Glycinionen in ungleichen Ladungszuständen vorliegen.

Die eigentliche Gelelektrophorese von Proteinen wird in einer Matrix mit einer Konzentration von 10 % (w/v) Acryl-/Bisacrylamid durchgeführt. Für zwei mittelgroße Trenngele von je knapp 16 ml Volumen werden folgende Substanzen und Reagentien gemischt: 10,75 ml Acryl-/Bisacrylamid 30 % (w/v), 8,0 ml Tris-HCl 1,5 M und pH 8,9, 12,75 ml *aqua dest.* und 160 µl SDS 20 % (w/v). Mit Zugabe von 280 µl Ammoniumpersulfat 10 % (w/v) und 10 µl TEMED wird die Polymerisation eingeleitet, die Trenngellösung möglichst blasenfrei bis auf etwa 4,5 cm unterhalb der Glasplattenkanten einer mittleren Gelelektrophoreseapparatur gegossen und vorsichtig mit Butanol überschichtet und abgedichtet. Der Abschluss der Polymerisation ist nach 30-60 min bei Raumtemperatur erreicht. Nun wird das polymerisierte Trenngel gründlich von Butanol befreit und mit dem Sammelgel überschichtet, das aus folgenden Substanzen und Reagentien besteht: 1,25 ml Acryl-/Bisacrylamid 30 % (w/v), 1,25 ml Tris-HCl 1,0 M und pH 6,8, 6,0 ml *aqua dest.* und 50 µl SDS 20 % (w/v). Mit Zugabe von 100 µl Ammoniumpersulfat 10 % (w/v) und 10 µl TEMED wird erneut die Polymerisation eingeleitet, ein Kamm für die Auftragstaschen eingesetzt und 30 min bei Raumtemperatur abgewartet.

Für die weitere Vorbereitung wird die Gelelektrophoreseapparatur mit einfach konzentriertem Proteingellaufpuffer gefüllt und auch die Auftragstaschen damit blasenfrei ausgespült. Nun werden pro Auftragstasche 50 µg der zu untersuchenden Proteinproben mit *aqua dest.* auf ein Volumen von 45 µl aufgefüllt, mit 15 µl Laemmli-Probenpuffer versetzt und für 5 min bei 95 °C aufgeköcht. Sodann können die Auftragstaschen mit 10 µl des Kaleidoskopproteinmarkers und 60 µl der Proben beladen werden, bevor an die Apparatur eine Stromstärke von 16 mA angelegt und für etwa 12–15 h solange beibehalten wird, bis eine übersichtliche Verteilung der Proteinstandards mit Fokus auf das zu detektierende Protein erreicht ist. Dieses Gel kann nun für die Western-Blot-Analyse verwendet werden.

3.4.6 Western-Blot-Analyse

Die Western-Blot-Analyse dient hier zum Nachweis und zur Größeneinschätzung der nachzuweisenden Proteine aus den angefertigten Zellysaten. Die 1979 veröffentlichte Methode wird nach folgendem Schema durchgeführt (Towbin *et al.* 1979).

Die durch die Polyacrylamidgelelektrophorese aufgetrennten Proteine werden in einem elektrischen Feld einer Blottingapparatur auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dabei wird von der unten liegenden Anode zur oben liegenden Kathode der Aufbau wie folgt vorgenommen: drei mit Western-Blot-Puffer I getränkte Lagen Whatman-Papier, zwei mit Western-Blot-Puffer II getränkte Lagen Whatman-Papier, eine in Western-Blot-Puffer II äquilibrierte Nitrozellulosemembran, gefolgt vom ebenfalls in Western-Blot-Puffer II äquilibrierten Polyacrylamidgel, vier mit Western-Blot-Puffer III getränkte Lagen Whatman-Papier. Eventuell auftretende Luftblasen werden mit einer Glaspipette ausgerollt. Bei einer Stromstärke von 140 mA findet nun der Transfer über 60 min statt, eine erste Kontrolle ist durch Sichtbarwerden der Markerbanden auf der Nitrozellulosemembran möglich.

Unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran werden nun in einer Wanne auf einem Wippschüttler mit 10–20 ml Magermilchpulver enthaltenden Blockierpuffers über 60 min bei Raumtemperatur oder über Nacht bei 4 °C besetzt. Nach einem Waschschrift von etwa 5 min mit 20 ml TBS-T-Puffer wird die Nitrozellulosemembran mit dem spezifisch bindenden Antikörper in zuvor getesteten Verdünnungen, je nach Proteinkonzentration und Reinheit bei 1:40 und 1:400 liegend, in 10 ml Blockierpuffer über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert. Am darauf folgenden Tag kann der Überstand entfernt und die Nitrozellulosemembran mit jeweils 20 ml PBS-T-Puffer einmal für 10 min und dreimal für 5 min bei Raumtemperatur gewaschen und geschwenkt werden.

Zur Visualisierung der Bindungsstellen des Primärantikörpers wird nun ein System aus der Meerrettichperoxidase und einem Substrat, das durch die Enzymwirkung in eine Photonen emittierende Substanz umgewandelt wird. Dazu wird die Nitrozellulosemembran mit einem 1:1.000 verdünnten, peroxidasekonjugierten Sekundärantikörper in 10 ml Blockierpuffer über höchstens 60 min bei Raumtemperatur schwenkend inku-

biert. Anschließend wird die Transfermembran dreimal mit jeweils 20 ml TBS/T-Puffer und einmal mit 20 ml TBS-Puffer für jeweils 5 min bei Raumtemperatur gewaschen und geschwenkt, bevor die Membran kurz luftgetrocknet und die eigentliche Enzymreaktion mit dem ECLTM-Reagenz gestartet wird. Dazu werden die ECLTM-Lösungen 1 und 2 in gleichen Teilen zu einem Volumen von etwa 5 ml gemischt und in einem kleinen Gefäß für 60 min bei Raumtemperatur mit der Nitrozellulosemembran in Verbindung gebracht. Nach kurzer Trocknungsphase wird der Nitrozellulosemembran ein lichtgeschützter Röntgenfilm exponiert, der durch die emittierten Photonen für 10, 20, 30 oder 60 min geschwärzt wird. Anschließend kann der Röntgenfilm entwickelt, fixiert, gespült und analysiert werden.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Isolation von Ribonukleinsäuren

Um die Transkription bestimmter Gene auf der Ebene der mRNA nachzuweisen, muß zunächst das gesamte, in den Zellen existierende RNA-Gemisch extrahiert und isoliert werden. Die Isolation wird mit dem GenEluteTM Mammalian Total RNA Purification Kit durchgeführt, die entsprechend nötigen Lösungen und Puffer sind dabei gebrauchsfertig vorhanden und RNase-freie Bedingungen Voraussetzung.

Nach mindestens zweimaligen Waschschrritten werden $3-5 \cdot 10^6$ adhären oder in Suspension wachsende Zellen mit 500 µl Lysispuffer mit β-Mercaptoethanol versetzt und vorsichtig homogenisiert. Nun kann das erhaltene Lysat im blauen Säulenanteil filtriert und für 2 min zentrifugiert werden. Nach Verwerfen des blauen Filters wird dem Zentrifugat ein gleiches Volumen 70 % (v/v) Ethanol hinzugefügt und invertiert. Von dem Gemisch werden 700 µl entnommen, in die rote Säule pipettiert und für 1 min zentrifugiert. Nun kann die abzentrifugierte Lösung verworfen werden. Die in der Säule gebundene RNA wird mit jeweils 500 µl zweier verschiedener Waschpuffer 1 und 2 und Zentrifugationsschritten für 1 min dreimal gereinigt und letztlich mit 50 µl des Elutions-

puffers und einem Zentrifugationsschritt zurück in Lösung gebracht. Eine Lagerung der extrahierten RNA bei -20 oder -80 °C ist möglich.

3.5.2 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen wird photometrisch durchgeführt, wenn sichergestellt ist, dass die Nukleinsäurelösungen weitgehend frei von Verunreinigungen sind. Dabei werden $5\ \mu\text{l}$ der zu untersuchenden Lösung mit $95\ \mu\text{l}$ *aqua dest.* verdünnt und in für Ultraviolettlcht durchlässige Küvetten, sogenannte UVetten[®], überführt. Über die Messung der Extinktion im Ultraviolettbereich bei einer Wellenlänge von $260\ \text{nm}$ gegenüber einer Kontrolllösung von $100\ \mu\text{l}$ *aqua dest.* erhält man die Nukleinsäurekonzentrationen unter Annahme folgender Faktoren: 1.000 Einheiten E_{260} entsprechen einer RNA-Konzentration von $40\ \mu\text{g/ml}$ oder äquivalent einer DNA-Konzentration von $50\ \mu\text{g/ml}$. Durch Einrechnung der eingesetzten Verdünnungsstufe erhält man die Nukleinsäurekonzentrationen. Gleichzeitig wird die Extinktion der Probenlösung im Ultraviolettbereich bei einer Wellenlänge von $280\ \text{nm}$ gemessen, der Quotient E_{260}/E_{280} gebildet und daraus der Reinheitsgrad der Probelösung als Qualitätskontrolle festgestellt. Reine RNA-Präparationen weisen einen Quotienten von $2,0$, reine DNA-Präparationen einen Quotienten zwischen $1,8$ und $2,0$ auf.

3.5.3 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese dient zur Kontrolle von RNA- und DNA-Präparationen und zur Dokumentation von Amplifikationsprodukten nach der Durchführung einer Polymerase-Kettenreaktion. Die 1989 veröffentlichte Methode nutzt hierbei die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten negativ geladener Moleküle in einer Agarosematrix, an die ein elektrisches Feld angelegt wird (Sambrook *et al.* 1989). Kleinere Fragmente der negativ geladenen Nukleinsäuren finden sich nach Anlage eines elektrischen Feldes über eine bestimmte Zeiteinheit anodennäher als größere Fragmente.

Für den Nachweis von DNA, aber auch von RNA, wird $1,0\ \%$ (w/v) Agarose als Pulver in $50\text{--}60\ \text{ml}$ TAE-Puffer im Mikrowellengerät sooft kurz aufgeköcht, bis keine

Schlieren mehr zu sehen sind. Nach Abkühlung unter kühlendem Wasser auf etwa 50 °C und Zugabe von 10 µl einer Ethidiumbromidlösung zu einer Endkonzentration von etwa 0,1 µg/ml wird die Agaroselösung in einen Gelträger gegossen und ein entsprechender Kamm zur Aussparung der Ausgangstaschen eingesetzt. Nach Polymerisation der Agaroselösung zum Agarosegel wird der Gelträger in die Elektrophoreseapparatur mit TAE-Puffer eingesetzt und der Kamm vorsichtig entfernt. Nun können die Ausgangstaschen mit den DNA-Proben, die zuvor mit 10 % (v/v) Farbpuffer 10x versehen worden sind, beladen werden. Nach der elektrophoretischen Auftrennung der DNA-Moleküle in einem angelegten elektrischen Feld von 90 V werden diese in einem Transilluminator unter Ultraviolettlicht sichtbar gemacht und fotografiert.

3.5.4 Reverse Transkription

Zum Nachweis spezifischer Sequenzen von transkribierten Genabschnitten wird die aus Zelllysaten isolierte mRNA in einzelsträngige, komplementäre cDNA umgeschrieben, die dann als Matrize für die Amplifikation spezifischer Nukleinsäuresequenzen für die PCR verwendet wird. Ein erster Schritt ist die Bindung von Desoxythymidin-Oligonukleotiden an das polyadenylierte Ende des heterogenen Gemischs aus mRNA. Nun kann durch die reverse Transkriptase eine Kopie der Nukleinsäuresequenz in Form stabiler cDNA erzeugt werden.

Der Reaktionsansatz für die Synthese der cDNA setzt sich aus verschiedenen Komponenten zusammen, RNase-freie Pipettenspitzen und Reaktionsgefäße sind dabei Voraussetzung. Etwa 0,65 µg totale RNA, je nach Konzentration in Volumina von 1,0-7,0 µl, 1,0 µl p(dT)₁₅-Primer und 1,0 µl dNTP Mixes 2 mM werden vermischt, mit DEPC-H₂O auf ein Volumen von 12,0 µl aufgefüllt, kurz zentrifugiert und zur Einzelstrangtrennung für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach einer schnellen Abkühlung auf Eis werden 4,0 µl First-Strand-Puffer 5x, 2,0 µl Dithiothreitol 0,1 M und 1,0 µl des rekombinanten RNase-Inhibitors zugefügt. Der Reaktionsansatz wird nun gemischt, kurz zentrifugiert, für 2 min bei 42 °C temperiert, dann um 1,0 µl der reversen Transkriptase ergänzt und erneut gemischt. Es folgt eine Inkubationsphase von 50 min bei 42 °C und

eine Inaktivierungsphase von 15 min bei 70 °C. Die generierte cDNA kann bei –20 oder –80 °C eingefroren oder direkt für die PCR verwendet werden.

3.5.5 Polymerase-Kettenreaktion

Die 1985 publizierte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki *et al.* 1985) dient nun zum Nachweis bestimmter Sequenzen im cDNA-Gemisch. Die einzelnen temperaturabhängigen Schritte der Denaturierung, des Annealings und der Extension werden nach entsprechender manueller Programmierung eines Thermocyclers automatisch vorgegeben.

Der Reaktionsansatz für die Amplifikation spezifischer Gensequenzen umfasst folgende Komponenten. In ein Reaktionsgefäß werden 21 µl *aqua dest.* vorgelegt, je 1,0 µl der der Gensequenz entsprechenden Forward- und Reverse-Primer hinzupipettiert, 2,0 µl der zu untersuchenden cDNA zugefügt und um ein PuRe Taq Ready-To-Go™ PCR Bead ergänzt. Da die Abdeckung des Thermocyclers nicht beheizbar ist, wird der Reaktionsansatz nach kurzer Zentrifugation in der Tischzentrifuge mit 30 µl Mineralöl überschichtet. Nach vorsichtigem Einlegen der Reaktionsgefäße werden nun die einzelnen, sich überwiegend wiederholenden, zeitabhängigen Temperatureinstellungen programmiert und ausgeführt.

Zunächst wird mit einer Vorabsequenz begonnen, für die Denaturierung bei 95 °C werden 2 min, für das Annealing bei 56 °C 1 min und für die Extension bei 72 °C ebenfalls 1 min eingeräumt. Anschließend folgen 30 Zyklen nach folgendem Muster: Denaturierung bei 95 °C für 45 s, Annealing für 56 °C für 45 s und Extension bei 72 °C für 1 min. Die letzte Sequenz sieht für die Denaturierung bei 95 °C 1 min, für das Annealing bei 56 °C 1 min und für die Endextension bei 72 °C 2 min vor. Danach wird die Temperatur auf 0 °C heruntergefahren und bis zur Entnahme der Proben gehalten. Das Amplikon kann nun durch die Agarose-Gelelektrophorese sichtbar gemacht werden.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der Endothelzellen

4.1.1 Voruntersuchungen zur Kultur von Endothelzellen

Um hervorragende Bedingungen für die Amplifikation und das Ausbilden von konfluenten Zellrasen möglichst ohne Lücken und Überwachsungen zu erzielen, wurde zunächst das Adhärenz- und Wachstumsverhalten der verwendeten Endothelzellen auf unterschiedlichen Oberflächen von Zellkulturflaschen, -platten oder Kammerobjektträgern untersucht. Kunststoffmaterialien, die mit einer 0,5 % (w/v) Gelatinelösung beschichtet wurden, boten dabei ordentliche Voraussetzungen, da HUVEC und HBMEC sehr gut an der Oberfläche hafteten und einen konfluenten Monolayer ausbildeten. Ohne jegliche Beschichtung traten vermehrt Lücken und Überwachsungen auf. Eine Quervernetzung der Kollagenfibrillen mit 2 % (v/v) Glutardialdehyd war nur bei Einsatz von Glasmaterialien zum Erzielen ähnlicher Bedingungen vonnöten. Wegen der erhöhten Zelltoxizität von Glutardialdehyd wurde die Verwendung von Glasmaterialien vermieden.

4.1.2 Morphologie der Endothelzellen

Neben der sorgsamem, protokollgenauen Durchführung der Isolation von HUVEC war schon die Morphologie und das Wachstumsverhalten der Zellen in der Phasenkontrastmikroskopie ein wichtiges Kriterium für die erfolgreiche Isolation von HUVEC. In Abgrenzung vor allem zu Fibroblasten und glatten Muskelzellen zeigten sich HUVEC als einschichtig und konfluierend wachsende, pflastersteinartige Verbände nah aneinander liegender, großer, flacher, polygonaler Zellen mit einem Zellkern und meist mehreren

Nukleoli. Schon nach kurzer Adhärenzzeit von etwa 1–2 h waren bei dünner Aussaat Zellnester mit HUVEC zu erkennen. Eventuell im Überstand befindliche Erythrozyten aus nicht ausspülbaren, intravenösen Blutkoageln konnten durch mehrmaliges Waschen entfernt werden. Abbildung 4.1 zeigt Beispiele für in Kultur genommene HUVEC knapp 24 h nach ihrer Isolation aus der Nabelschnurvene.

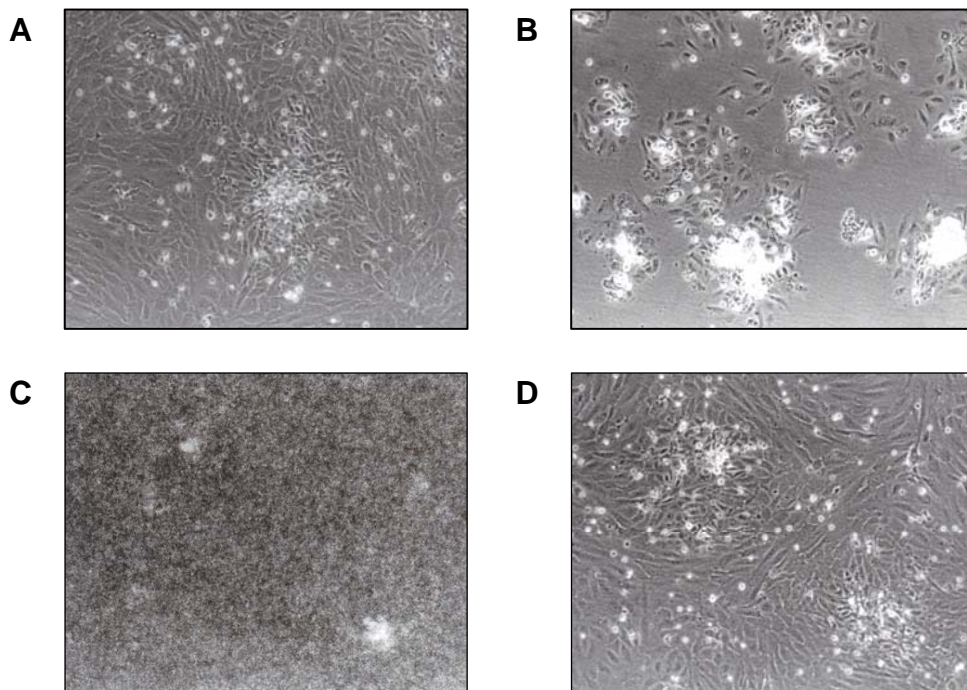


Abbildung 4.1: Mikroskopische Darstellung von HUVEC 24 h nach ihrer Isolation.

Dicht (A) oder dünn (B) ausgesäte, frisch isolierte Zellsuspension nach einer Ruhezeit von 24 h. Kultur von HUVEC mit massenhaft Erythrozyten aus kleinen intravenösen Blutkoageln im Überstand vor (C) und nach (D) einmaligem Waschen. Vergrößerung 125x.

HUVEC und HBMEC unterschieden sich in ihrer Morphologie und ihrem Wachstumsverhalten. Abbildung 4.2 verdeutlicht den Unterschied zwischen den beiden Zellarten. Im Vergleich zu HUVEC, die sich als große, flache, polygonale Zellen einschichtig, konfluierend und pflasterstein- bzw. kachelartig nah aneinander liegend ausbreiteten, muß man HBMEC als etwas kleinere und rundlichere, flache Zellen bezeichnen, bei denen sich einzelne Zellen oder Zellausläufer *in vitro* gelegentlich über dem einschichtigen Zellrasen erhaben ausbildeten. Quantifiziert und vergleicht man die Zell-

dichte der beiden Endothelzellarten kurz nach Erreichen der Konfluenz, so zeigt sich, dargestellt in Tabelle 4.1, dass die Zelldichte von HBMEC die von HUVEC etwa um den Faktor 1,75 übersteigt.

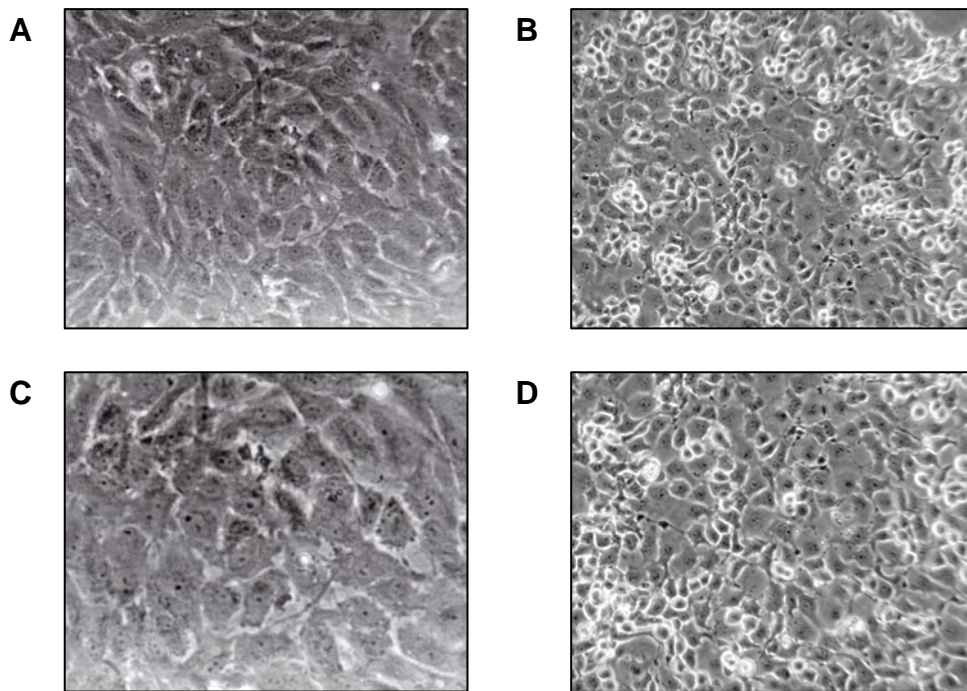


Abbildung 4.2: Morphologie und Wachstumsverhalten von HUVEC und HBMEC.

Vergleich der Morphologie und des Wachstumsverhaltens von HUVEC (A, C) und HBMEC (B, D) nach Erreichen der Konfluenz. Vergrößerungen 250x (A, B) und 400x (C, D).

Zellart	Zelldichte
HUVEC	$165.158 \pm 24.641^*$ Zellen/cm ²
HBMEC	$294.584 \pm 35.200^*$ Zellen/cm ²

Tabelle 4.1: Vergleich der Zelldichte von HUVEC und HBMEC.

Mittelwert und einfache Standardabweichung (*) vom Mittelwert nach vier unabhängigen Messungen.

4.1.3 Expression von Endothelzellmarkern und Adhäsionsmolekülen

Zur Charakterisierung und zur Überprüfung der Endothelzeleigenschaften von HUVEC und HBMEC wurden die Expression und die Bindung einiger endothelzellspezifischer Moleküle immunfluoreszenzmikroskopisch und durchflusszytometrisch bestimmt. Zu den wichtigsten endothelzellspezifischen Markerproteinen gehört der von-Willebrand-Faktor. Das Lektin *Ulex-europaeus*-Agglutinin I als weiterer wichtiger Marker bindet spezifisch an endotheliale Glykoproteine und Glykolipide und kann fluoreszenzmikroskopisch visualisiert werden.

Unter den Oberflächenmolekülen, die die Leukozytenadhäsion an Endothelzellen vermitteln, ist CD54, das ICAM-1, ein sehr wichtiger, allerdings ein weit verbreiteter und damit kein spezifischer Vertreter, CD62E, das E-Selektin, hingegen wird kurzfristig nach entsprechender Stimulation nur von Endothelzellen exprimiert und kann daher ebenfalls als endothelzellspezifischer Marker fungieren. Neben der ubiquitären Ausstattung von humanen Zellen mit den HLA-Molekülen HLA-Klasse-I finden sich bei Endothelzellen auch antigenpräsentierende Eigenschaften in Form von HLA-Klasse-II-Molekülen. Daher wurde neben der Expression der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD62E und des HLA-Moleküls HLA-Klasse-I die stimulationsabhängige Expression des HLA-Moleküls HLA-Klasse-II analysiert, die die antigenpräsentierende Eigenschaft der Endothelzellen unterstreichen sollte.

Abbildung 4.3 zeigt die immunfluoreszenzmikroskopische Färbung des in intrazellulären Vesikeln gespeicherten von-Willebrand-Faktors. Bei HUVEC war bis zur 2. Passage die Existenz des großen und hämostaseologisch wichtigen Proteinmultimers nachweisbar, bei HBMEC in der 16.–18. Passage gelang dieser Nachweis nicht. In Abbildung 4.4 ist die Expression des von-Willebrand-Faktors in den Weibel-Palade-Körperchen von HUVEC noch einmal vergrößert dargestellt. Typisch ist hierbei eine längliche Morphologie der Vesikel.

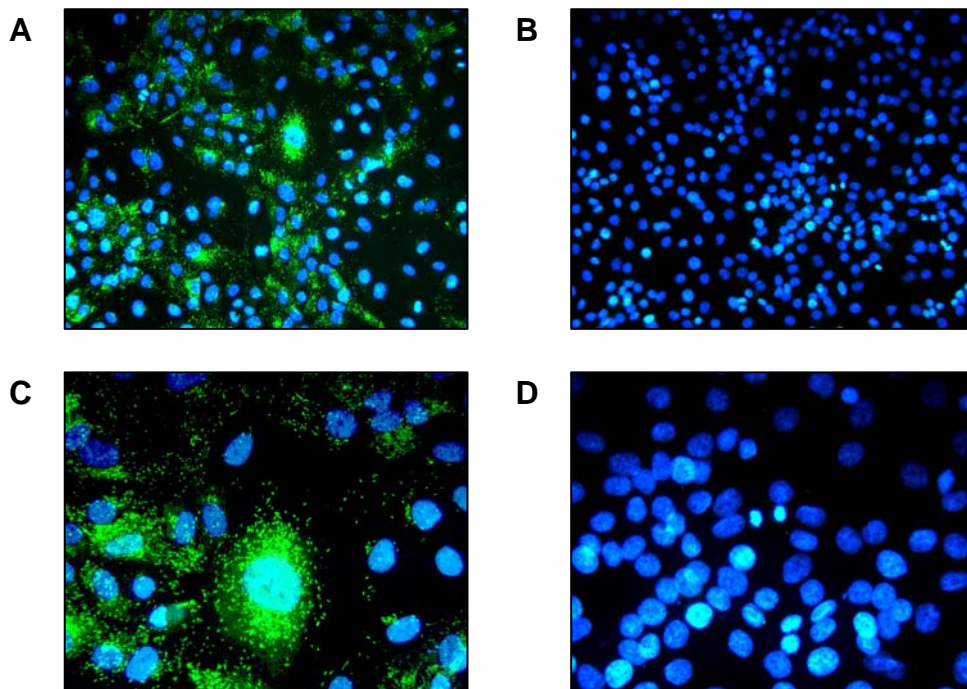


Abbildung 4.3: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des vWF bei HUVEC und HBMEC.

Immunfluoreszenzmikroskopische Bestimmung des endothelialen Markermoleküls vWF (grün), der sich in intrazellulären Vesikeln gespeichert darstellt, bei HUVEC (A, C) und HBMEC (B, D). Die Zellkerne (blau) sind mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt worden. Vergrößerungen 160x (A, B) und 400x (C, D).

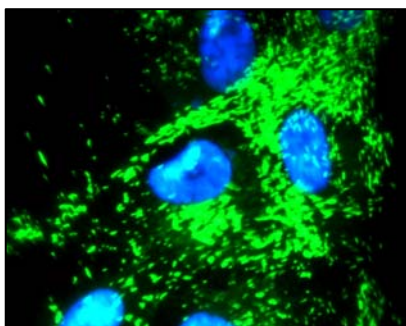


Abbildung 4.4: Speicherung des vWF in den Weibel-Palade-Körperchen von HUVEC.

Immunfluoreszenzmikroskopische Bestimmung des vWF (grün) in den sich länglich darstellenden intrazellulären Vesikeln, den Weibel-Palade-Körperchen. Die Zellkerne (blau) sind mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt worden. Vergrößerung 1.000x.

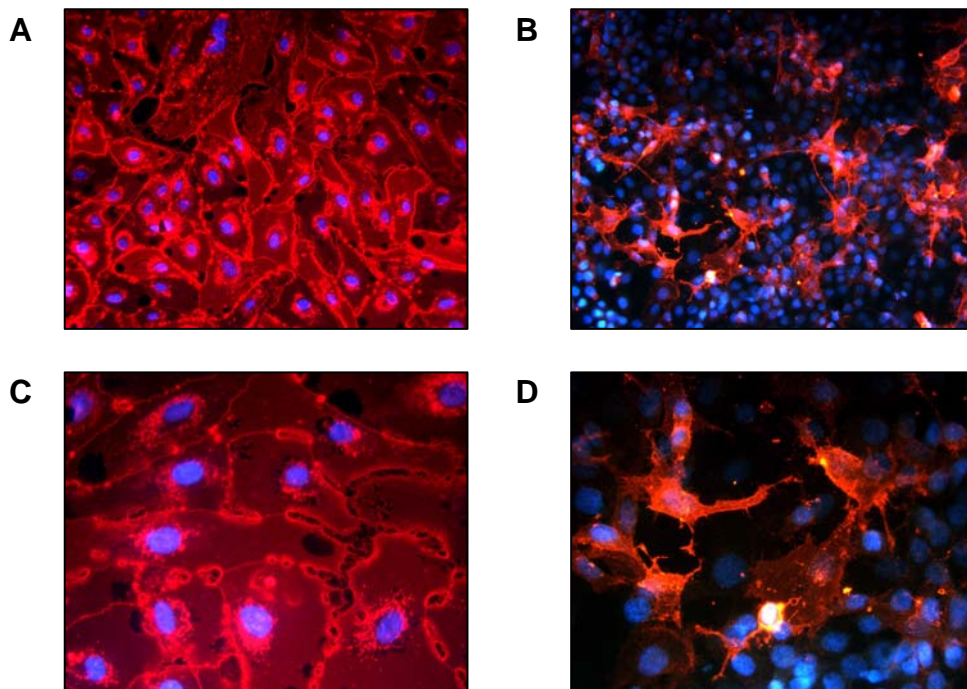


Abbildung 4.5: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von UEA-1 bei HUVEC und HBMEC.

Immunfluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Bindung von UEA-1 (rot) an die Oberfläche von HUVEC (A, C) und HBMEC (B, D). Die Zellkerne (blau) sind mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt worden. Vergrößerungen 160x (A, B) und 400x (B, D).

Die endothelzellspezifische Bindung des *Ulex-europaeus*-Agglutinins I war bei allen kultivierten HUVEC immunfluoreszenzmikroskopisch nachweisbar und bildete einen oberflächlichen, regelmäßigen Saum aus. HBMEC wiesen prozentual eine verminderte Bindung durch das Lektin auf, positive Zellen zeigten jedoch ein ausgeprägtes Fluoreszenzsignal. Diese Beobachtungen sind in Abbildung 4.5 exemplarisch dargestellt. Interessant war, dass HBMEC filiforme Ausläufer zu Nachbarzellen und zum Objektträgerboden ausbildeten.

Um die Expression des von-Willebrand-Faktors und Bindung des *Ulex-europaeus*-Agglutinins I zu quantifizieren, wurden die Fluoreszenzsignale durchflusszytometrisch gemessen und ausgewertet, die Ergebnisse sind in den Abbildungen 4.6 und 4.7 dargestellt. Im Histogramm zeigte sich bei HUVEC ein gegenüber der Isotypenkontrolle eindeutig nach rechts verschobenes, breitbasiges Fluoreszenzsignal als Ausdruck einer ausgeprägten Expression des von-Willebrand-Faktors und einer umfassenden Bindung

des Ulex-europaeus-Agglutinins I. Statistisch gesehen exprimieren mehr als 90 % der HUVEC den von-Willebrand-Faktor, anhand der Form der Histogrammkurve dürfen fast alle HUVEC so angesehen werden. Während bei HBMEC der Nachweis des von-Willebrand-Faktors immunfluoreszenzmikroskopisch nicht gelang, ergab die FACS-Analyse ein sehr geringes Fluoreszenzsignal, das knapp über 40 % der Zellen positiv bewertete und in seiner Intensität lediglich das der Isotypenkontrolle 2,7fach übertraf. Die durchflusszytometrische Messung der Bindung des Ulex-europaeus-Agglutinins I an HUVEC oder HBMEC offenbarte jedoch ein deutliches und, anhand der Form der Histogrammkurve zu urteilen, nahezu alle Zellen betreffendes Fluoreszenzsignal, das auch hier wieder eine schwächere Ausprägung bei HBMEC als bei HUVEC offenbarte.

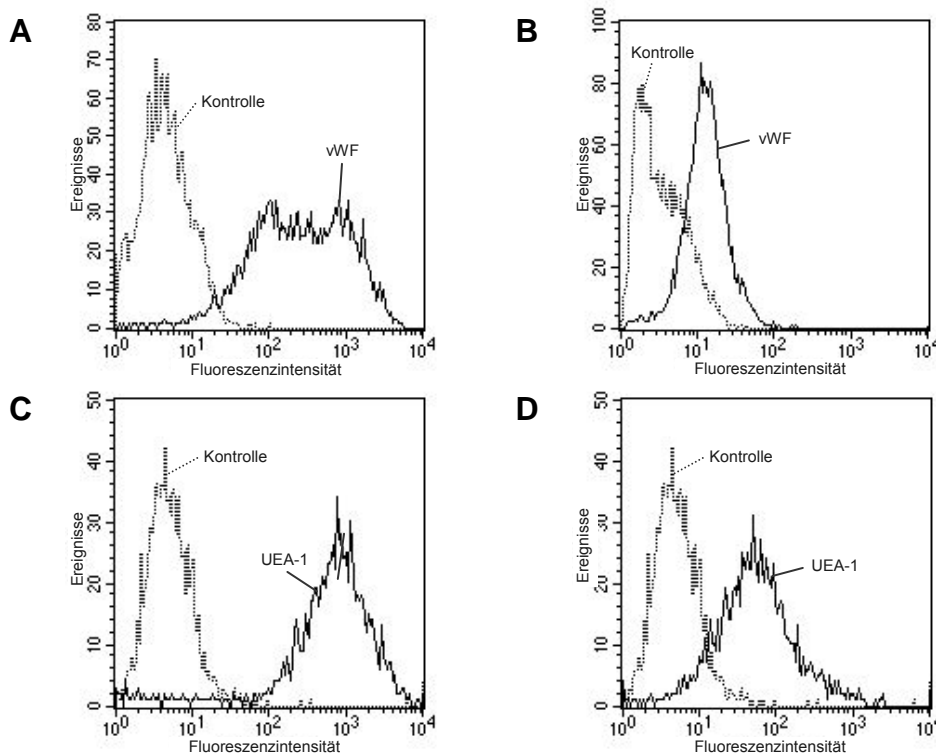


Abbildung 4.6: Zytometrische Darstellung des vWF und UEA-1 bei HUVEC und HBMEC.

FACS-Analyse der Expression von vWF (A, B) durch und der Bindung von UEA-1 (C, D) an HUVEC (A, C) und HBMEC (B, D) gegenüber einer Isotypenkontrolle.

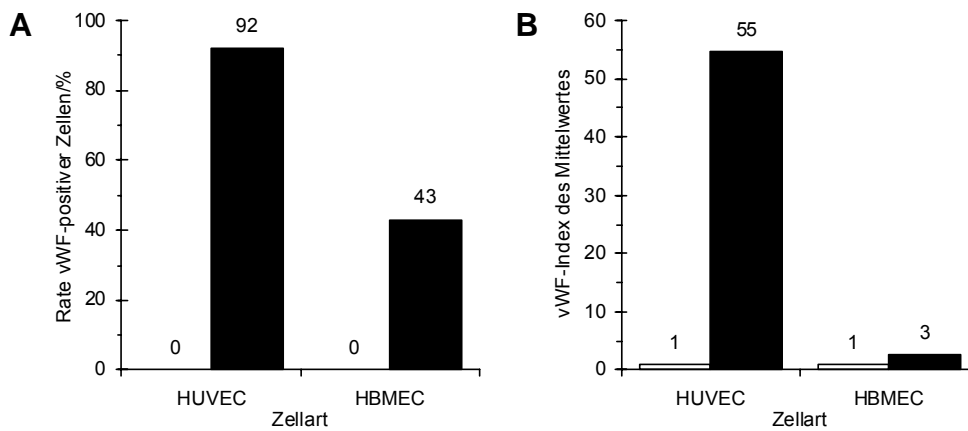


Abbildung 4.7: Übersicht über die Expression des vWF bei HUVEC und HBMEC.

Übersicht über die FACS-Analyse der Expression von vWF durch HUVEC und HBMEC. Dargestellt sind die Rate der fluoreszenzpositiven Zellen (A) und die Intensität des mittleren Fluoreszenzsignals als Index des Mittelwertes (B) gegenüber einer Isotypenkontrolle.

Eine Darstellung der Expression der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD62E sowie des HLA-Moleküls HLA-Klasse-II durch HUVEC und HBMEC in Abhängigkeit von Zeit und eingesetztem Stimulans bietet Abbildung 4.8. Die durchflusszytometrisch analysierte Intensität der Fluoreszenzsignale wurde gegenüber Isotypenkontrollen abgeglichen.

HUVEC und HBMEC wiesen ein durchgängig kontinuierliches Expressionsmuster von CD54 auf. Dieses Niveau konnte durch die Stimulation der Zellen mit IL-1 β und TNF- α signifikant gegenüber der Mediumkontrolle gesteigert werden. Quasi keinen Effekt auf das Expressionslevel zeigte die Stimulation mit IFN- α oder IFN- γ . Die Höchstwerte wurden nach etwa 6 h erreicht, dabei schien die Stimulation von HUVEC im Vergleich zu HBMEC von anhaltenderer Wirkung zu sein, die Intensität des Fluoreszenzsignals bei HBMEC war allerdings ausgeprägter.

Die Expressionskinetik von CD62E bestätigte die zu erwartenden Ergebnisse. Sehr zügig nach Beginn der Stimulation wurde eine starke Expression des endothelzellspezifischen Adhäsionsmoleküls durch die Zytokine IL-1 β und TNF- α induziert und zeigte schon nach etwa 6 h ihren Höhepunkt. Interessant allerdings ist, dass der stimulierende Effekt von IL-1 β auf die Expression von CD62E durch HBMEC ausblieb, während sich TNF- α als potentes Stimulans erwies.

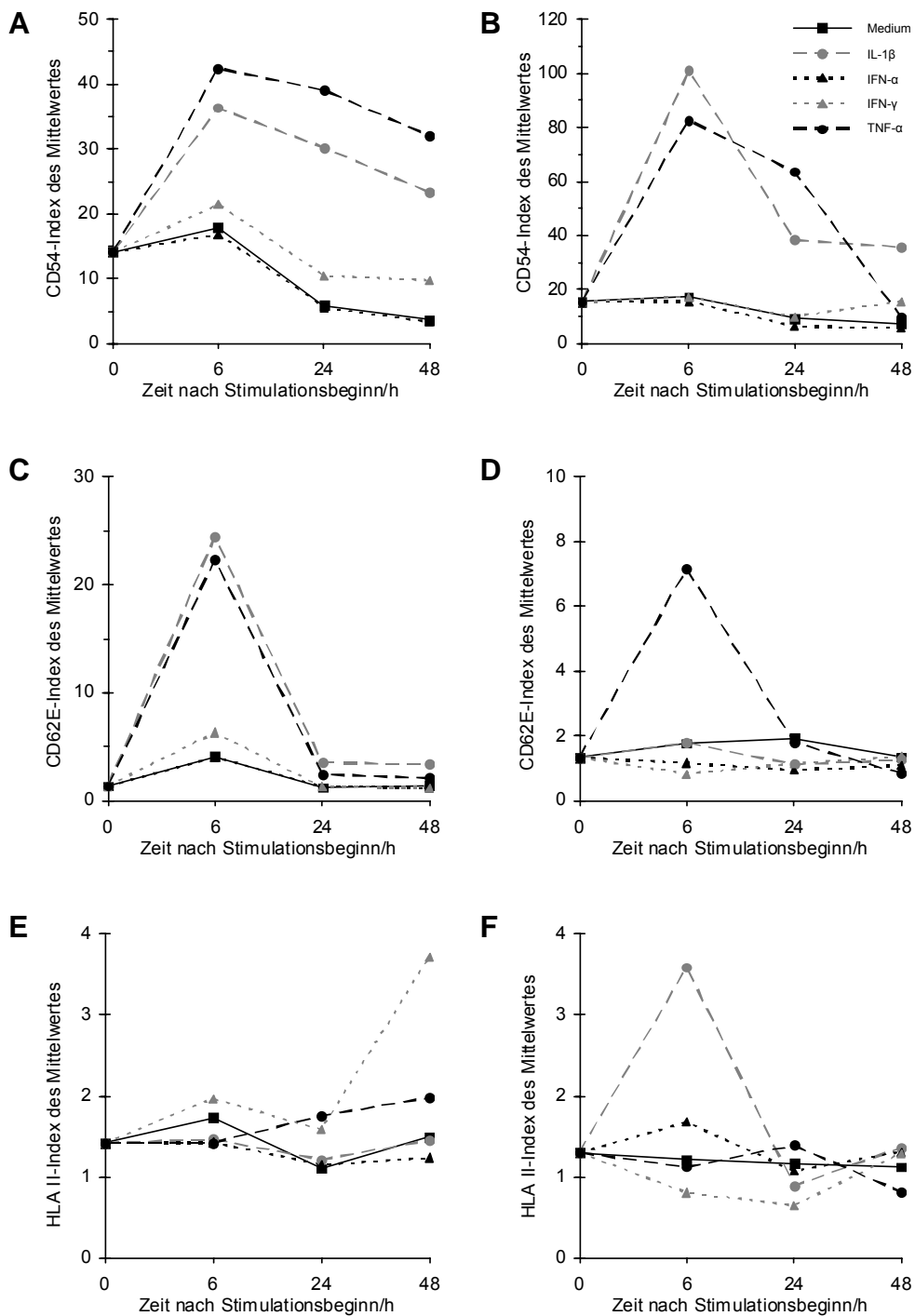


Abbildung 4.8: Expressionskinetik von CD54, CD62E und HLA-Klasse-II.

Durchflusszytometrische Expressionskinetik von CD54 (A, B), CD62E (C, D) und HLA-Klasse-II (E, F) bei HUVEC (A, C, E) und HBMEC (B, D, F) nach Stimulation mit IL-1 β 1.000 U/ml, IFN- α 1.000 U/ml, IFN- γ 200 U/ml oder TNF- α 200 U/ml gegenüber einer Mediumkontrolle. Legende s. (B).

Die Eigenschaft der Endothelzellen als antigenpräsentierende Zellart wurde durch die Messung des HLA-Moleküls HLA-Klasse-II über einen Zeitraum von bis zu 2 d untersucht. Nach Ablauf von 48 h ab dem Beginn der Stimulationsphase hob sich das Fluoreszenzmuster von HUVEC unter Stimulation mit IFN- γ deutlich gegenüber der Isotypenkontrolle ab, die Stimulation der Zellen mit IL-1 β , IFN- α oder TNF- α zeigte diesbezüglich erwartungsgemäß keinen Effekt auf die Expression des HLA-Moleküls. Ein differentes Verhalten ist für HBMEC anzumerken. Das HLA-Klasse-II-Molekül war bei HBMEC durch eine entsprechende Stimulation nicht nachweisbar, allerdings konnte ein positiver Fluoreszenzausschlag einer kleinen Subpopulation der HBMEC nach sechsständiger Stimulation mit IL-1 β verzeichnet werden.

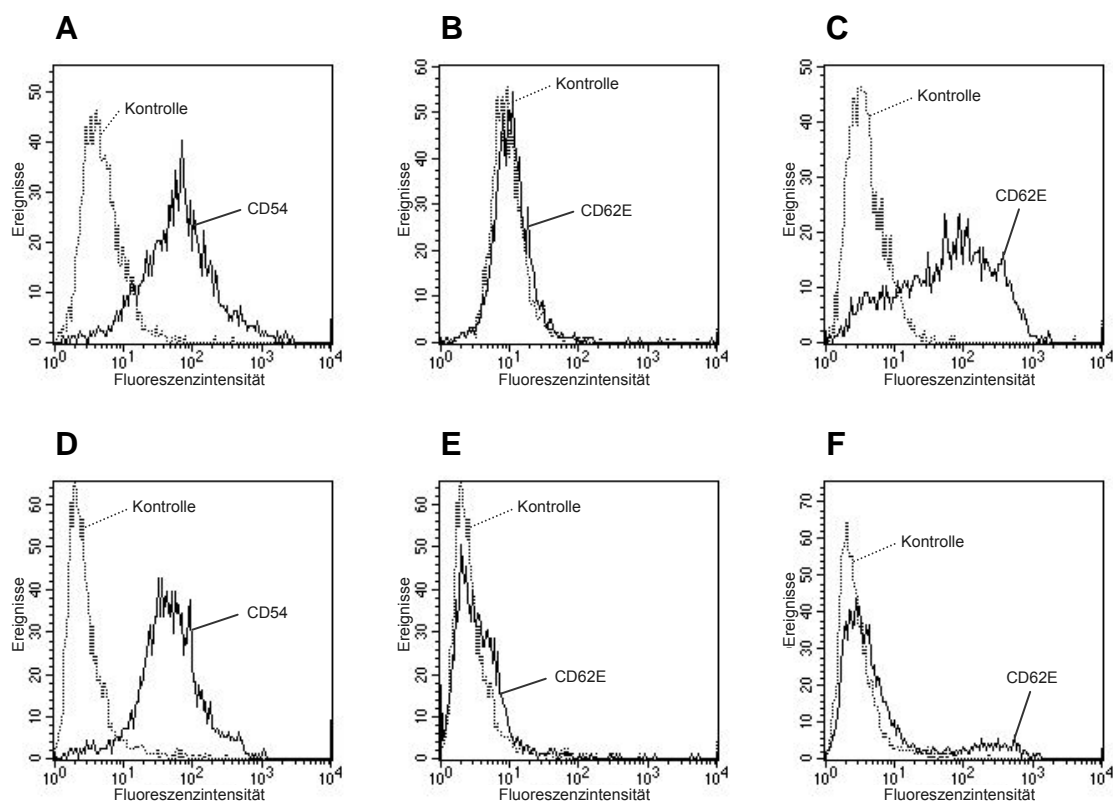


Abbildung 4.9: Zytometrische Darstellung von CD54 und CD62E.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der Adhäsionsmoleküle CD54 (A, D) und CD62E (B, C, E, F) bei HUVEC (A–C) und HBMEC (D–F) gegenüber einer Isotypenkontrolle. Zur Messung der Expression von CD62E wurden HUVEC und HBMEC für 6 h mit TNF- α 200 U/ml (C, F) vorstimuliert.

Die durchflusszytometrisch gewonnenen Daten dieser Versuchsanordnung sind in den Abbildungen 4.9 und 4.10 als FACS-Diagramme und in Abbildung 4.11 als Übersicht in Form eines Säulendiagramms exemplarisch und noch einmal zusammenfassend dargestellt. Hinsichtlich der Expression von CD54 und HLA-Klasse-I waren bei unbehandelten HUVEC und HBMEC eindeutige Fluoreszenzsignale nahezu aller Zellen nachweisbar. Das Expressionsniveau von CD54 konnte durch die Stimulation der Zellen mit IL-1 β oder TNF- α über 6 h noch um das bis zu knapp 6fache gesteigert werden. Einen gewissen stimulierenden Effekt auf das Ausmaß der Expression von CD54 und HLA-Klasse-II hatte dabei auch die zweitägige Stimulation mit den Interferonen IFN- α und IFN- γ , unter der die Intensität des durchschnittlichen Fluoreszenzsignals für CD54 oder HLA-Klasse-I um das bis zu 3fache anstieg.

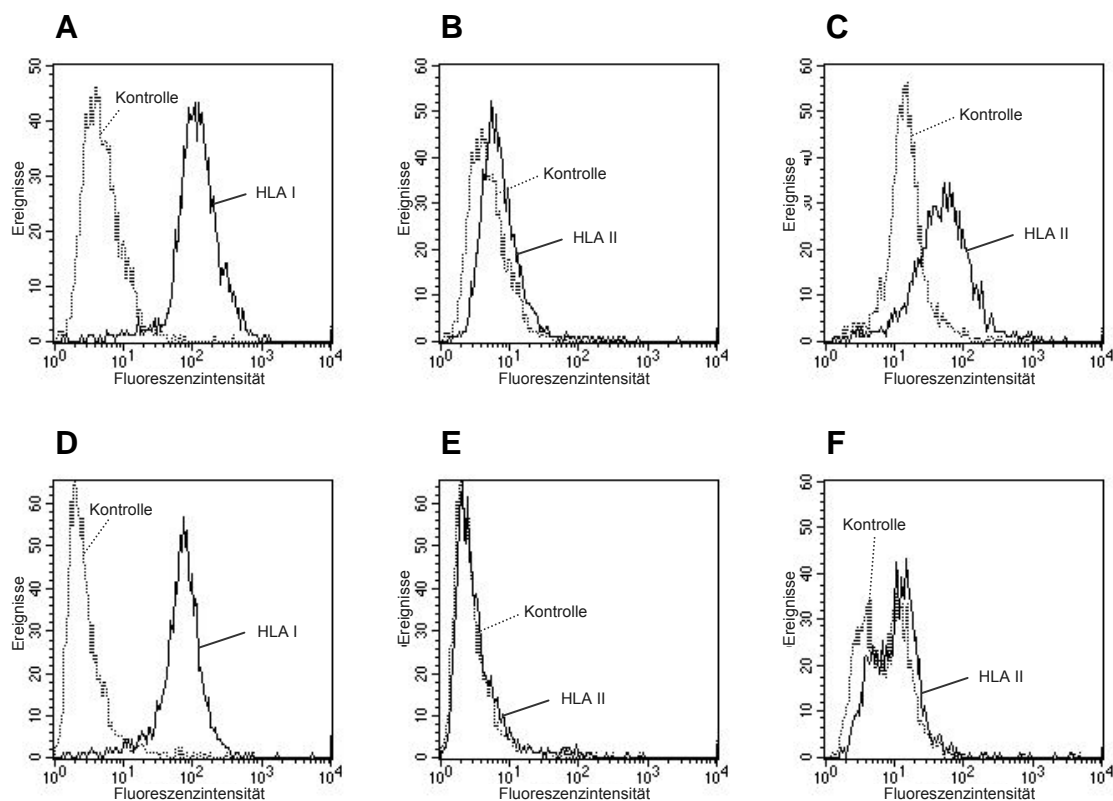


Abbildung 4.10: Zytometrische Darstellung von HLA-Klasse-I und -II.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der HLA-Moleküle HLA-Klasse-I (A, D) und -II (B, C, E, F) bei HUVEC (A–C) und HBMEC (D–F) gegenüber einer Isotypenkontrolle. Zur Messung der Expression von HLA-Klasse-II wurden HUVEC und HBMEC für 48 h mit IFN- γ 200 U/ml (C, F) vorstimuliert.

Wurden HUVEC und HBMEC ohne weitere Behandlung auf die Expression von CD62E und HLA-Klasse-II hin überprüft, wiesen die untersuchten Zellen kein gegenüber der Isotypenkontrolle abweichendes Fluoreszenzsignal auf. Lediglich HUVEC waren nahezu als Gesamtpopulation imstande, nach ihrer Stimulation mit TNF- α über 6 h CD62E oder mit IFN- γ über 48 h HLA-Klasse-II signifikant an ihrer Zelloberfläche zu präsentieren. Bei HBMEC war nur eine kleine Subpopulation von 10–15 % der Zellen in der Lage, CD62E nach sechsständiger Stimulation mit TNF- α zu exprimieren. Eine vergleichbare Anzahl HBMEC offenbarte nach sechsständiger Stimulation mit IL-1 β ein gegenüber der Isotypenkontrolle deutlich positives Fluoreszenzsignal bei Messung des HLA-Klasse-II-Moleküls. Die Stimulation mit IFN- γ erwies sich als kein potentes Mittel, eine Expression des HLA-Klasse-II-Moleküls zu induzieren.

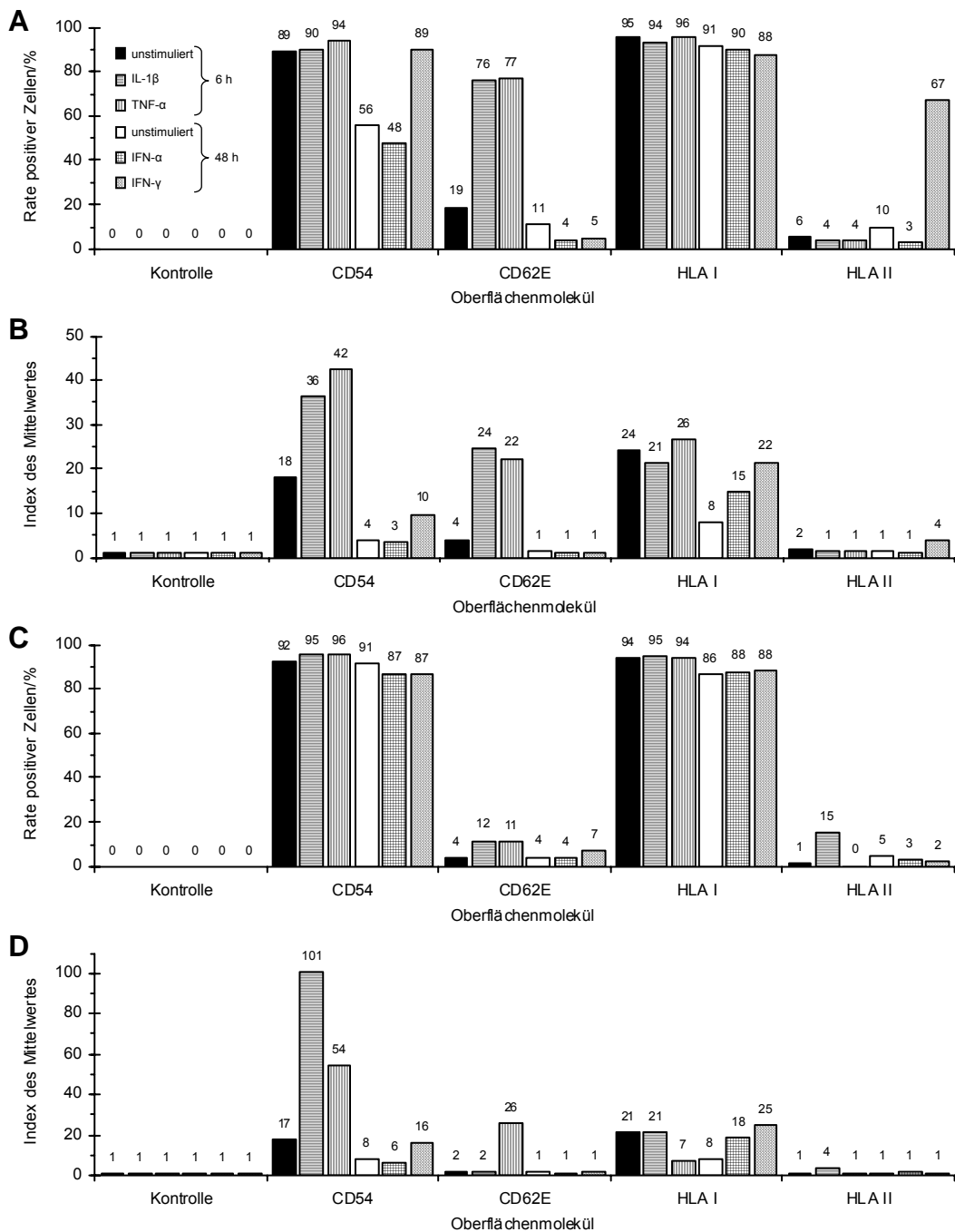


Abbildung 4.11: Übersicht über die Expression von Adhäsions- und HLA-Molekülen.

Quantitative Darstellung der Expression der Adhäsionsmoleküle CD54 und CD62E sowie der HLA-Moleküle HLA-Klasse-I und -II bei stimulierten und nichtstimulierten HUVEC (A, B) und HBMEC (C, D). Dargestellt sind die Rate der fluoreszenzpositiven Zellen (A, C) und die Intensität des mittleren Fluoreszenzsignals als Index des Mittelwertes (B, D) gegenüber einer Isotypenkontrolle. Legende s. (A).

4.2 Expression von Masernvirusrezeptoren durch Endothelzellen

4.2.1 Transkription von Masernvirusrezeptoren

Untersucht man die Wechselwirkung zwischen Masernviren und Endothelzellen, ist eine genaue Analyse der Expression der bekannten Masernvirusrezeptoren CD46 und SLAM durch die verwendeten Zellarten HUVEC und HBMEC unablässig. Um den Nachweis der Proteinexpression schon auf der frühen Ebene zwischen der Transkription und Translation zu führen, wurde die Methode der RT-PCR eingesetzt, die unter der Voraussetzung, dass die zu untersuchenden Proteine konstitutiv exprimiert werden, schließlich proteinspezifische Sequenzen sehr sensitiv und spezifisch detektieren kann.

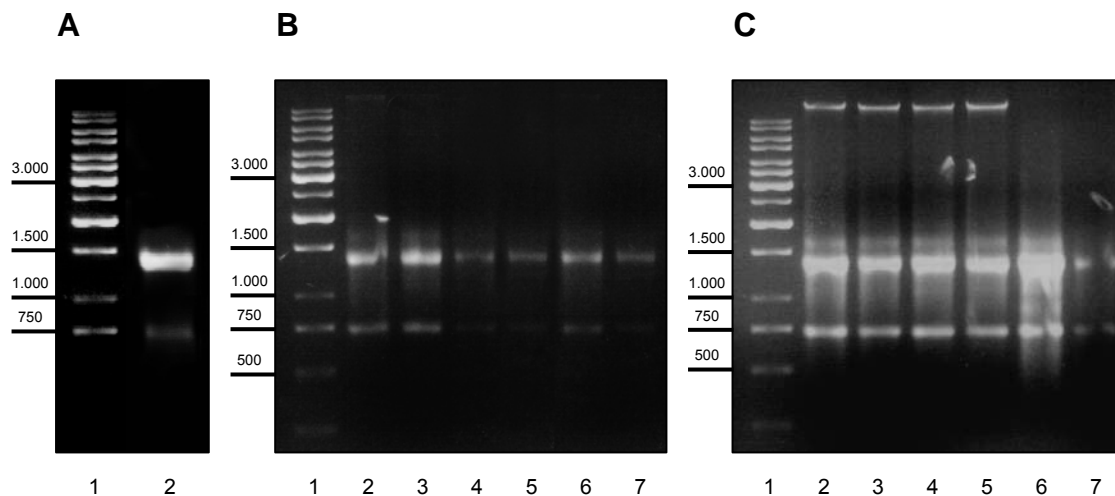


Abbildung 4.12: Gesamt-RNA von BJAB-Zellen, HUVEC und HBMEC.

Gelelektrophoretische Auftrennung der Gesamt-RNA von BJAB-Zellen (A), HUVEC (B) und HBMEC (C). Spuren: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (1), unbehandelte Zellen (2), mit IL-1 β 100 U/ml (3), mit TNF- α 1.000 U/ml (4) oder mit LPS 1 μ g/ml (5) für 48 h stimulierte Zellen, mit UV-inaktiviertem WTFb (6) oder Wü4797 (7) bei einer MOI von 1 für 2 h inkubierte Zellen.

In Abbildung 4.12 ist die gelelektrophoretische Auftrennung der gesamten intrazellulären RNA nach ihrer Isolation aus BJAB-Zellen, HUVEC und HBMEC dargestellt. Als Hauptbestandteil der gesamten zellulären RNA zeigt sich eine typische Verteilung von

28S- und 18S-rRNA als klare Banden. Das heterogene Gemisch der mRNA ist in seiner diffusen Verteilung nicht abzugrenzen. Die unterschiedliche Ausbeute und die daher differierenden Konzentrationen der RNA wurden durch Einsatz entsprechender Volumina für den Schritt der reversen Transkription ausgeglichen.

Nach der reversen Transkription konnte nun das heterogene Gemisch der stabilen cDNA unter Verwendung der eigens dafür konzipierten und bereits genannten Primerpaare auf das Vorhandensein von humanen, CD46- und SLAM-spezifischen Sequenzen hin analysiert werden. Zur qualitativen Kontrolle der PCR und groben quantitativen Abschätzung der Amplifikationsprodukte wurde zusätzlich eine Gensequenz des ubiquitär vorhandenen Proteins β -Aktin amplifiziert. Als Positivkontrolle fungierte RNA, die aus einer unbehandelten Population von BJAB-Zellen gewonnen wurde.

Die Amplifikationsprodukte für den Nachweis humaner CD46- und SLAM-spezifischer mRNA bei unbehandelten und stimulierten HUVEC und HBMEC sind in den Abbildungen 4.13, 4.14 und 4.15 zu finden. Bei beiden Endothelzellarten konnte CD46-

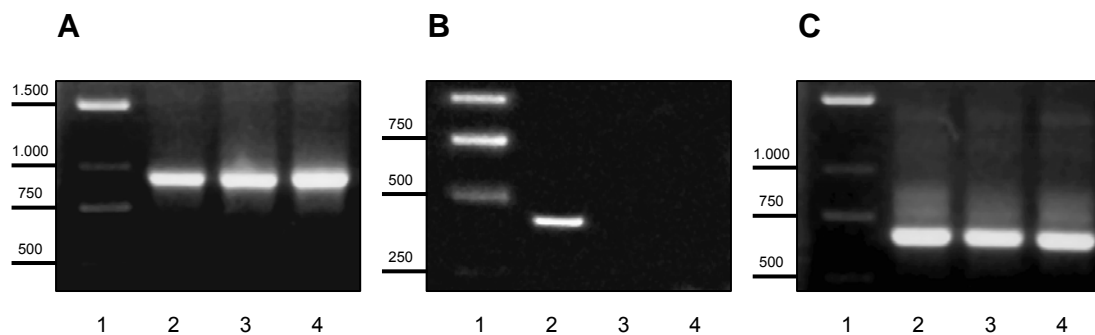


Abbildung 4.13: Nachweis von CD46- und SLAM-spezifischer mRNA.

Nachweis von CD46- (A) und SLAM-spezifischer mRNA (B) bei BJAB-Zellen, HUVEC und HBMEC gegenüber einer β -Aktin-Kontrolle (C) mittels RT-PCR. Amplifikationsprodukte: CD46 935 bp, SLAM 445 bp, β -Aktin 661 bp. Spuren: GeneRulerTM 1 kb DNA Ladder (1), BJAB-Zellen (2), HUVEC (3) und HBMEC (4).

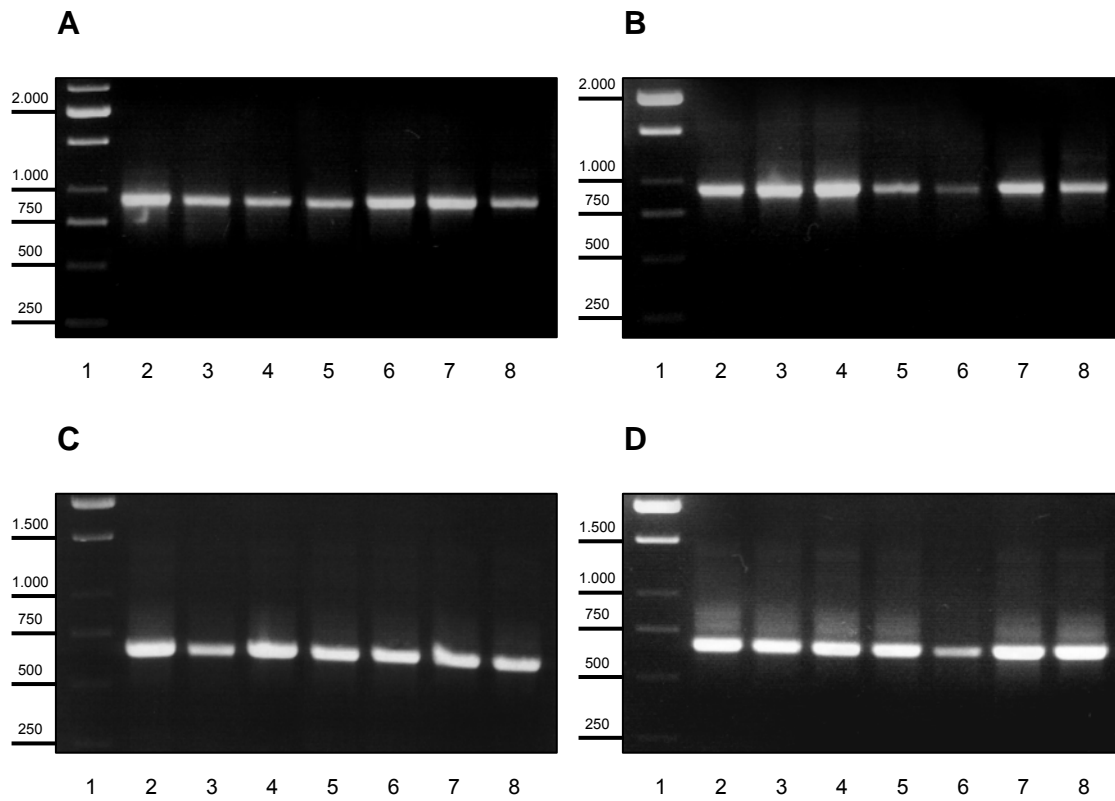


Abbildung 4.14: Nachweis von CD46-spezifischer mRNA bei stimulierten HUVEC und HBMEC.

Nachweis von CD46-spezifischer mRNA (A, B) bei HUVEC (A, C) und HBMEC (B, D) gegenüber einer β -Aktin-Kontrolle (C, D) mittels RT-PCR. Amplifikationsprodukte: CD46 935 bp, β -Aktin 661 bp. Spuren: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (1), HUVEC oder HBMEC (2–7), ohne Stimulation (2), Stimulation mit IL-1 β 100 U/ml (3), TNF- α 1.000 U/ml (4) oder LPS 1 μ g/ml (5) für 48 h, Inkubation mit UV-inaktiviertem WTFb (6) oder Wü4797 (7) bei einer MOI von 1 für 2 h, als Kontrolle BJAB-Zellen (8).

spezifische mRNA nachgewiesen werden, ihr RNA-Pool wies aber im Gegensatz zu BJAB-Zellen kein SLAM-spezifisches Transkript auf.

Um die Expression von SLAM bei Endothelzellen möglicherweise induzieren zu können, wurden HUVEC und HBMEC verschiedentlich stimuliert oder mit inaktivierten Masernviren inkubiert. Hintergrund dieses Versuchs ist auch der gelungene Nachweis von TLR2-spezifischen Transkripten bei HUVEC und HBMEC, der in Abbildung 4.16 gezeigt ist. Weder die Stimulation von HUVEC und HBMEC mit IL-1 β in einer Konzentration von 100 U/ml, TNF- α in einer Konzentration von 1.000 U/ml oder Lipopolysaccharid in einer Konzentration 1 μ g/ml über 48 h noch die Inkubation der Zellen

mit UV-inaktiviertem WTFb oder Wü4797 2 h vor der RNA-Extraktion bei einer MOI von 1 hatten einen Einfluss auf das Expressionsverhalten. Zusammenfassend ist nun davon auszugehen, dass HUVEC und HBMEC den Masernvirusrezeptor CD46 ausreichend bilden können, SLAM jedoch weder konstitutiv noch nach Stimulation auf mRNA-Ebene zu exprimieren in der Lage sind.

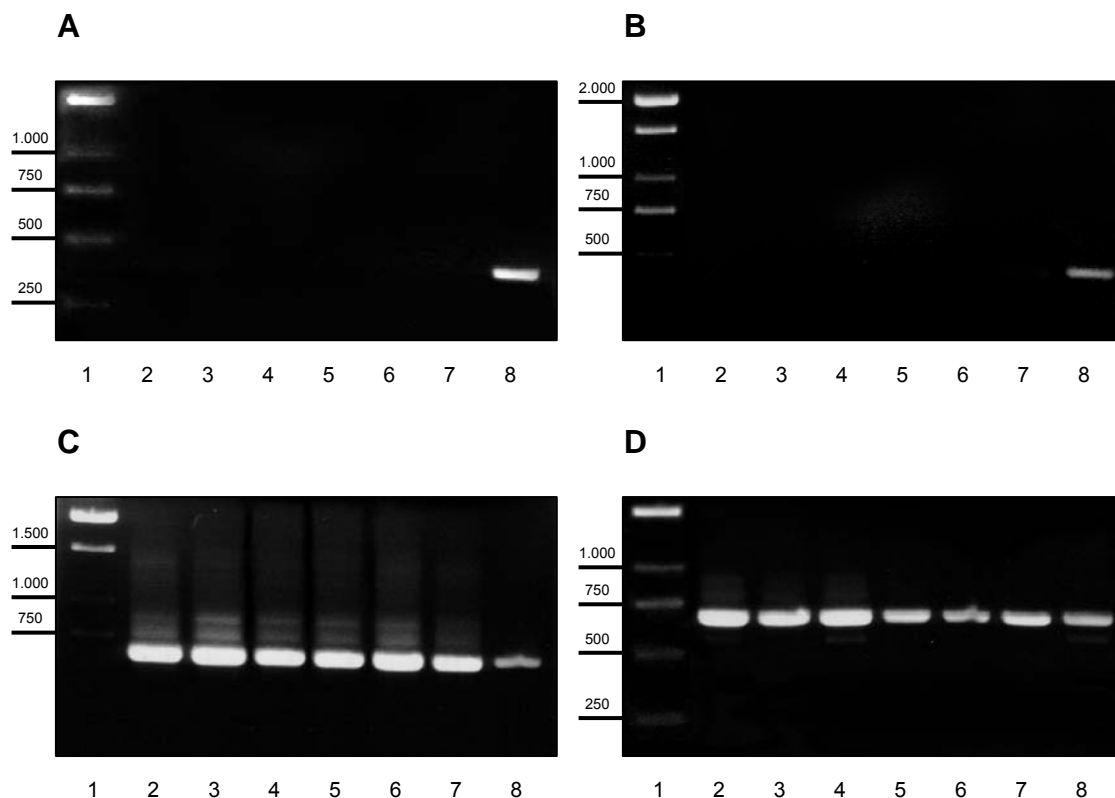


Abbildung 4.15: Analyse von SLAM-spezifischer mRNA bei stimulierten HUVEC und HBMEC.

Analyse von SLAM-spezifischer mRNA (A, B) bei HUVEC (A, C) und HBMEC (B, D) gegenüber einer β -Aktin-Kontrolle (C, D) mittels RT-PCR. Amplifikationsprodukte: SLAM 445 bp, β -Aktin 661 bp. Spuren: GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder (1), HUVEC oder HBMEC (2–7), ohne Stimulation (2), Stimulation mit IL-1 β 100 U/ml (3), TNF- α 1.000 U/ml (4) oder LPS 1 μ g/ml (5) für 48 h, Inkubation mit UV-inaktiviertem WTFb (6) oder Wü4797 (7) bei einer MOI von 1 für 2 h, als Kontrolle BJAB-Zellen (8).

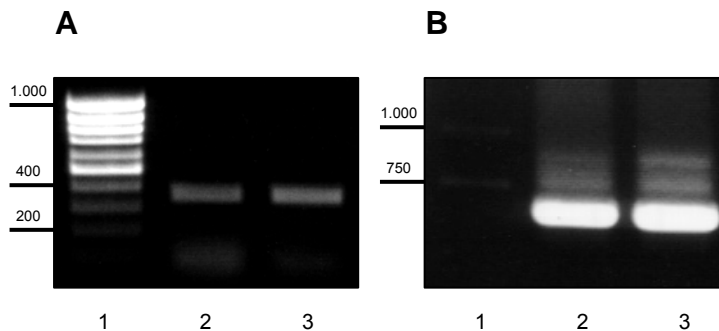


Abbildung 4.16: Nachweis von TLR2-spezifischer mRNA bei HUVEC und HBMEC.

Nachweis von TLR2-spezifischer mRNA (A) bei HUVEC und HBMEC gegenüber einer β -Aktin-Kontrolle (B) mittels RT-PCR. Amplifikationsprodukte: TLR2 347 bp, β -Aktin 661 bp. Spuren: GeneRuler™ 100 bp (A) oder 1 kb (B) DNA Ladder (1), unbehandelte HUVEC (2) und HBMEC (3).

4.2.2 Expression von Masernvirusrezeptorproteinen

Die Expression der Masernvirusrezeptoren an der Oberfläche der Endothelzellen wurde durchflusszytometrisch bestimmt. Exemplarische Ergebnisse der Messungen für den Nachweis von CD46 sind in Abbildung 4.17 zu sehen. HUVEC und HBMEC zeigten deutliche Fluoreszenzsignale nahezu aller gemessenen Zellen, die Fluoreszenzsignale der Zellen nach ihrer Stimulation mit IL-1 β , TNF- α , IFN- α oder IFN- γ über 48 h wichen nicht erkennbar von dem der Mediumkontrolle ab.

Andere Ergebnisse wurden bei der Analyse des Masernvirusrezeptors SLAM erzielt. Abbildung 4.18 zeigt auch hier ausführliche exemplarische Messungen. Selbst unter Einsatz der drei von verschiedenen Klonen stammenden, SLAM-spezifischen Antikörper 5C6, A12 und IPO-3, die allesamt eindeutige Fluoreszenzsignale bei SLAM-exprimierenden B95a-Zellen erzeugten, war der Masernvirusrezeptor bei HUVEC und HBMEC auch durchflusszytometrisch nicht nachweisbar. Auch die Stimulation der Zellen mit IL-1 β , TNF- α , IFN- α oder IFN- γ über ebenfalls 48 h hatte keinerlei Einfluss auf dieses Expressionsverhalten. Die in Abbildung 4.19 gezeigte Expressionskinetik von CD46 und SLAM bei HUVEC und HBMEC in Abhängigkeit der Stimulation über maximal 48 h untermauert noch einmal diese Beobachtungen. Interessanterweise ist vielmehr eine Verminderung der Expression von CD46 über diesen Zeitraum hinweg

auffällig, die möglicherweise auf die zunehmende Zelldichte während der Versuchsanordnung zurückgeführt werden kann.

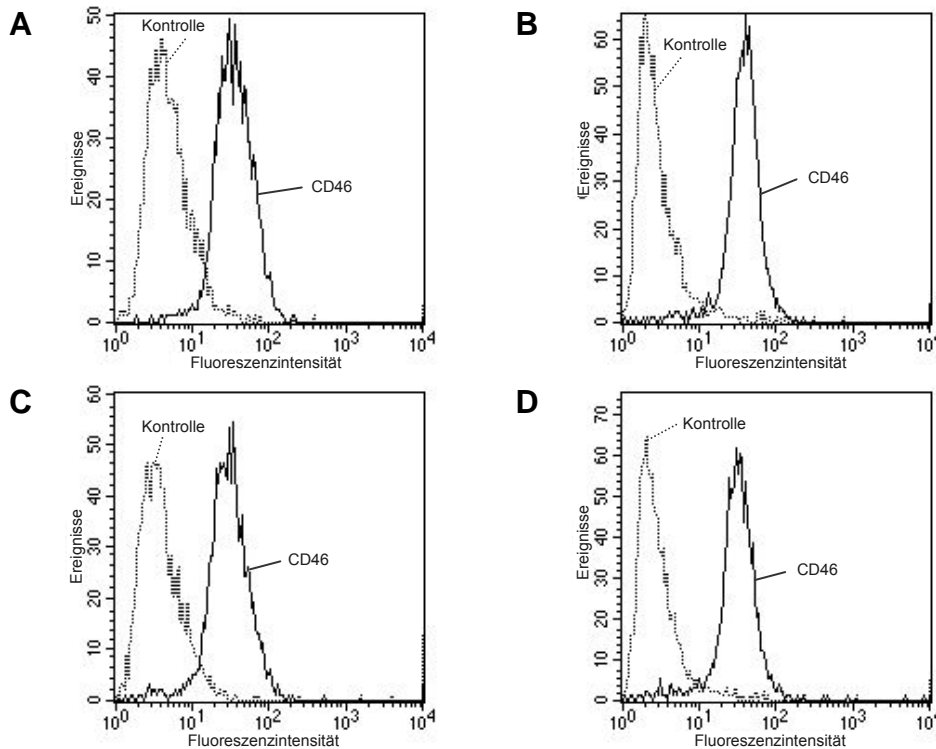


Abbildung 4.17: Expression von CD46 durch HUVEC und HBMEC.

FACS-Analyse der Expression von CD46 durch HUVEC (A, C) und HBMEC (B, D) unter Verwendung des CD46-spezifischen mAk 13/42 gegenüber einer Isotypenkontrolle. HUVEC und HBMEC wurden unbehandelt verwendet (A, B) oder mit TNF- α 200 U/ml für 6 h stimuliert (C, D).

Eine Übersicht über die Intensität der durchflusszytometrisch gemessenen Fluoreszenzsignale bietet Abbildung 4.20. Nahezu die gesamte Population B95a-Zellen offenbarte erwartungsgemäß eine ausgeprägte Expression von SLAM. Die mit SLAM verwandten Moleküle CD48 und CD58, die möglicherweise ähnliche Proteinsequenzen wie SLAM aufweisen und daher auch als mögliche Masernvirusrezeptoren fungieren können, waren nicht nachweisbar. Weder HUVEC noch HBMEC exprimierten SLAM an ihrer Oberfläche, ein Umstand, der durch die Verwendung dreier verschiedener SLAM-spezifischer Antikörper noch einmal untermauert wurde. Der monoklonale Antikörper IPO-3

zeigte als einziger ein diskretes Fluoreszenzsignal vor allem bei HBMEC, das in einer gegenüber der Isotypenkontrolle erhöhten Rate fluoreszenzpositiver Zellen und einem erhöhten Index des Mittelwertes seinen Ausdruck fand. In der Form der Histogrammkurve gab es keinen Anhalt für eine erkennbare Rechtsverschiebung oder eine fluoreszenzpositive Subpopulation. Wie bei B95a-Zellen war auch bei Endothelzellen keine Oberflächenexpression von CD48 oder CD58 nachweisbar.

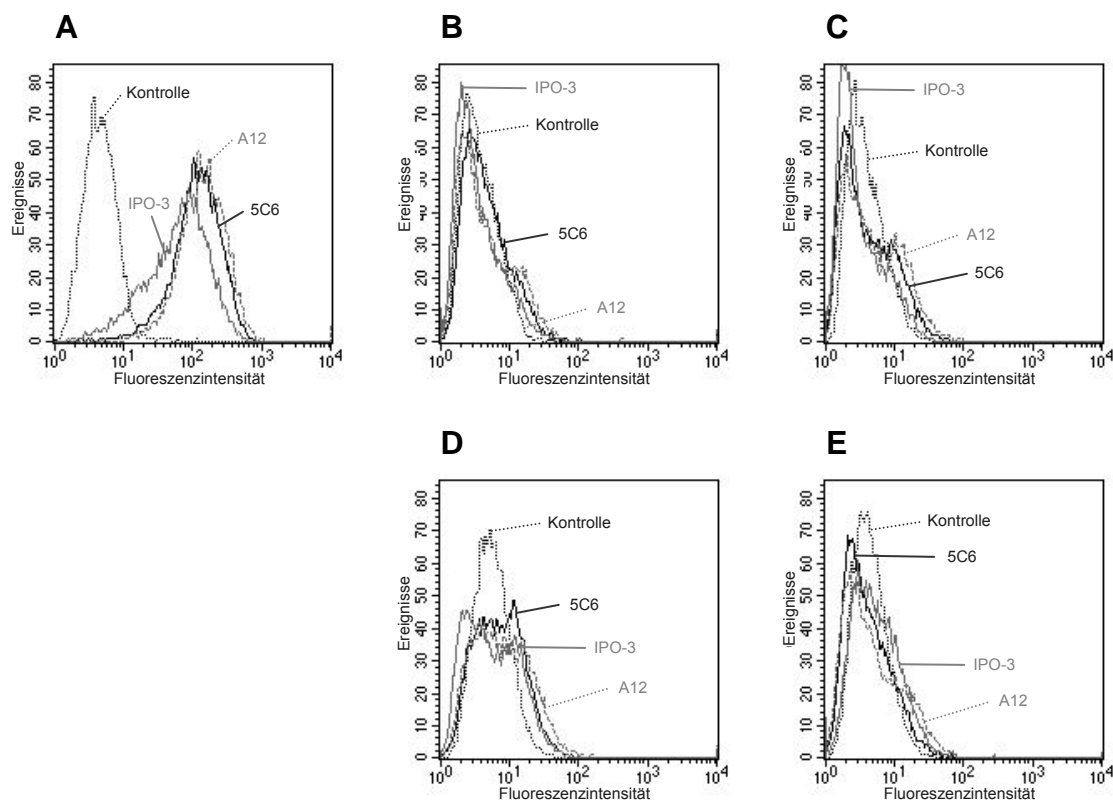


Abbildung 4.18: Expression von SLAM durch B95a-Zellen, HUVEC und HBMEC.

FACS-Analyse der Expression von SLAM durch B95a-Zellen (A), HUVEC (B, D) und HBMEC (C, E) unter Verwendung der SLAM-spezifischen mAk 5C6, A12 und IPO-3 gegenüber einer Isotypenkontrolle. HUVEC und HBMEC wurden entweder unbehandelt verwendet (B, C) oder mit IL-1 β 1.000 U/ml für knapp 24 h stimuliert (D, E).

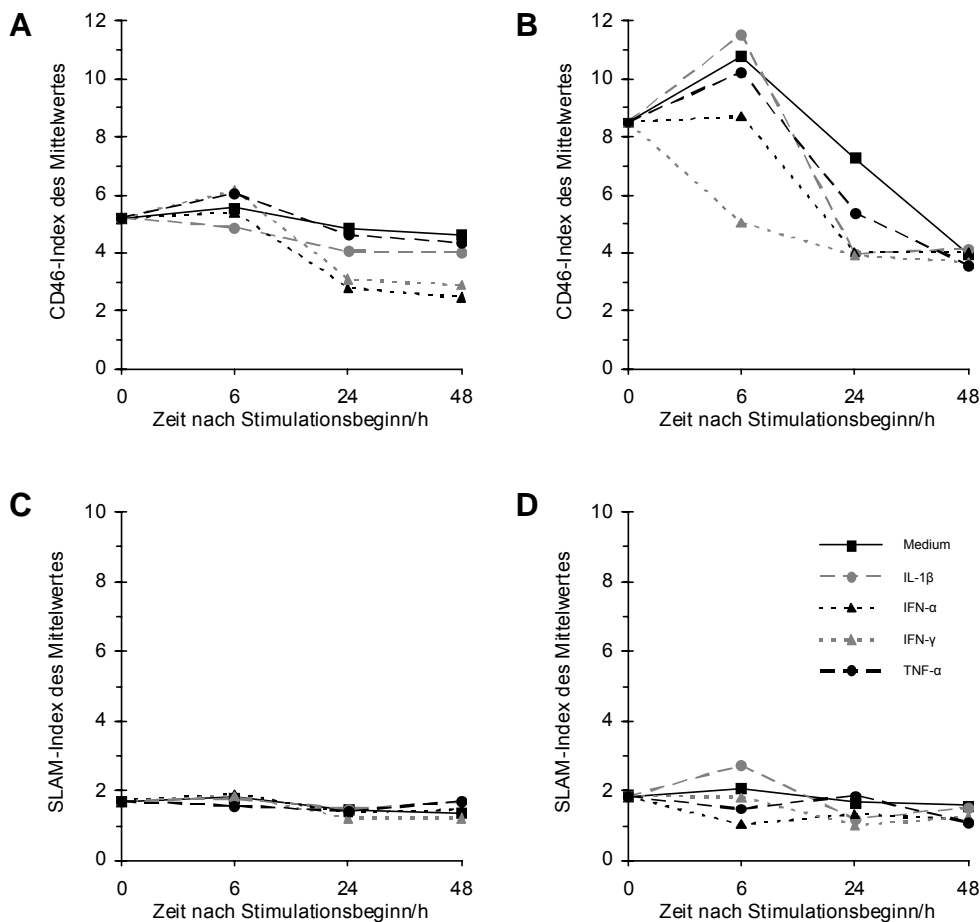


Abbildung 4.19: Expressionskinetik von CD46 und SLAM bei HUVEC und HBMEC.

Durchflusszytometrische Expressionskinetik von CD46 (A, B) und SLAM (C, D) bei HUVEC (A, C) und HBMEC (B, D) nach Stimulation mit IL-1 β 1.000 U/ml, IFN- α 1.000 U/ml, IFN- γ 200 U/ml oder TNF- α 200 U/ml unter Verwendung der CD46- und SLAM-spezifischen mAk 13/42 und 5C6 gegenüber einer Mediumkontrolle. Legende s. (D).

Eine quantitative Zusammenfassung des Expressionsmusters ist in Abbildung 4.21 dargestellt. B95a-Zellen zeigten unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 5C6, der über diese Zelllinie hergestellt wurde, erwartungsgemäß eine markante Expression des Masernvirusrezeptors SLAM, dagegen keinerlei Expression von CD46 unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 13/42, der die bei B95a-Zellen nicht vorhandene äußere Domäne SCR1 erkennt. Die Vertreter der Endothelzellen HUVEC und HBMEC waren durch eine signifikante Expression von CD46 gekennzeichnet, ein Nachweis von

SLAM gelang nicht. Zusätzlich dienten zwei verschiedene, von CHO-K1 abstammende Zelllinien als Positivkontrollen für den Nachweis der Masernvirusrezeptoren. CHO-K1 zeigte als unbehandelte, native Zelllinie keine Expression von CD46 oder SLAM.

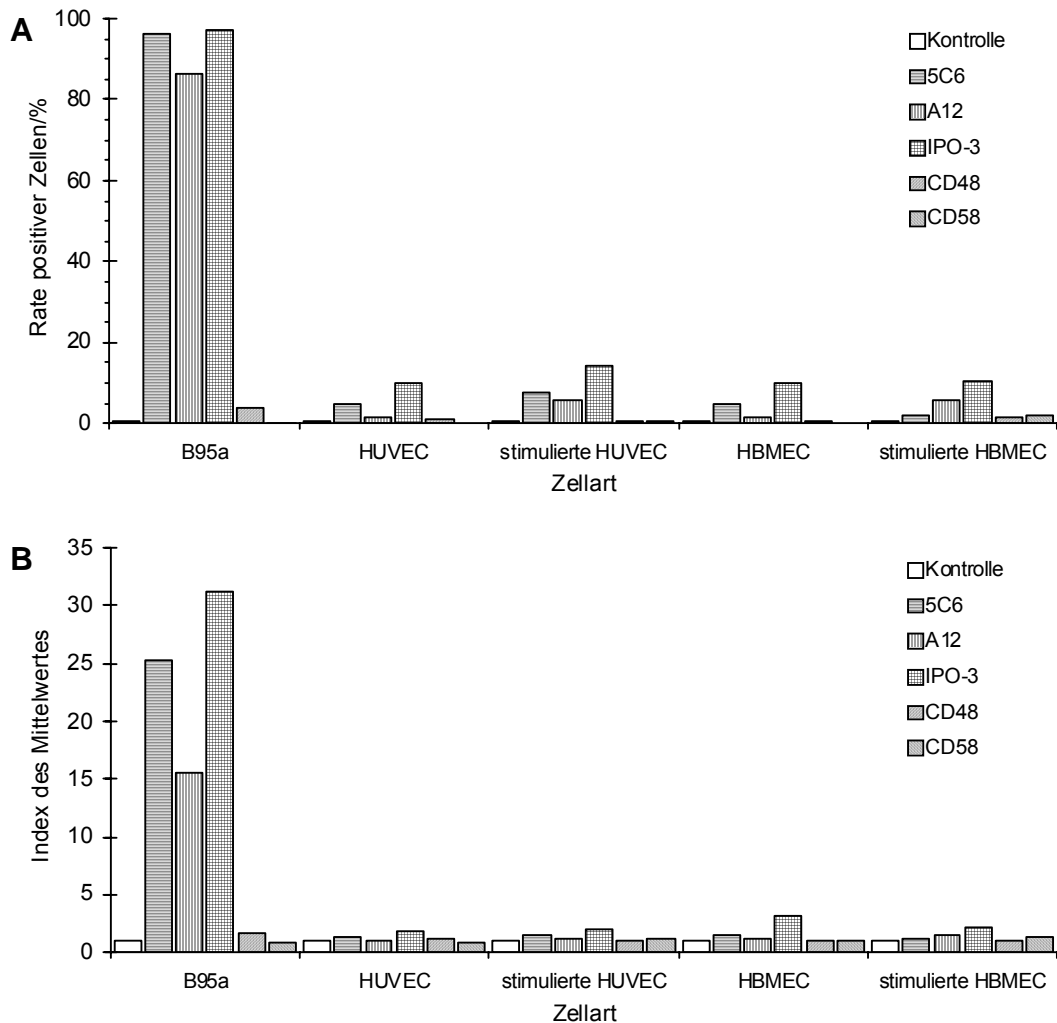


Abbildung 4.20: Expression von SLAM, CD48 und CD58 durch HUVEC und HBMEC.

Übersicht über die durchflusszytometrische Quantifizierung der Expression von SLAM, CD48 und CD58 durch HUVEC und HBMEC unter Verwendung der SLAM-spezifischen mAk 5C6, A12 und IPO-3. HUVEC und HBMEC wurden entweder unbehandelt oder mit IL-1 β 1.000 U/ml stimuliert. Als Positivkontrolle für die Expression von SLAM dienten B95a-Zellen. Dargestellt sind die Rate der fluoreszenzpositiven Zellen (A) und die Intensität des mittleren Fluoreszenzsignals als Index des Mittelwertes (B) gegenüber einer Isotypenkontrolle.

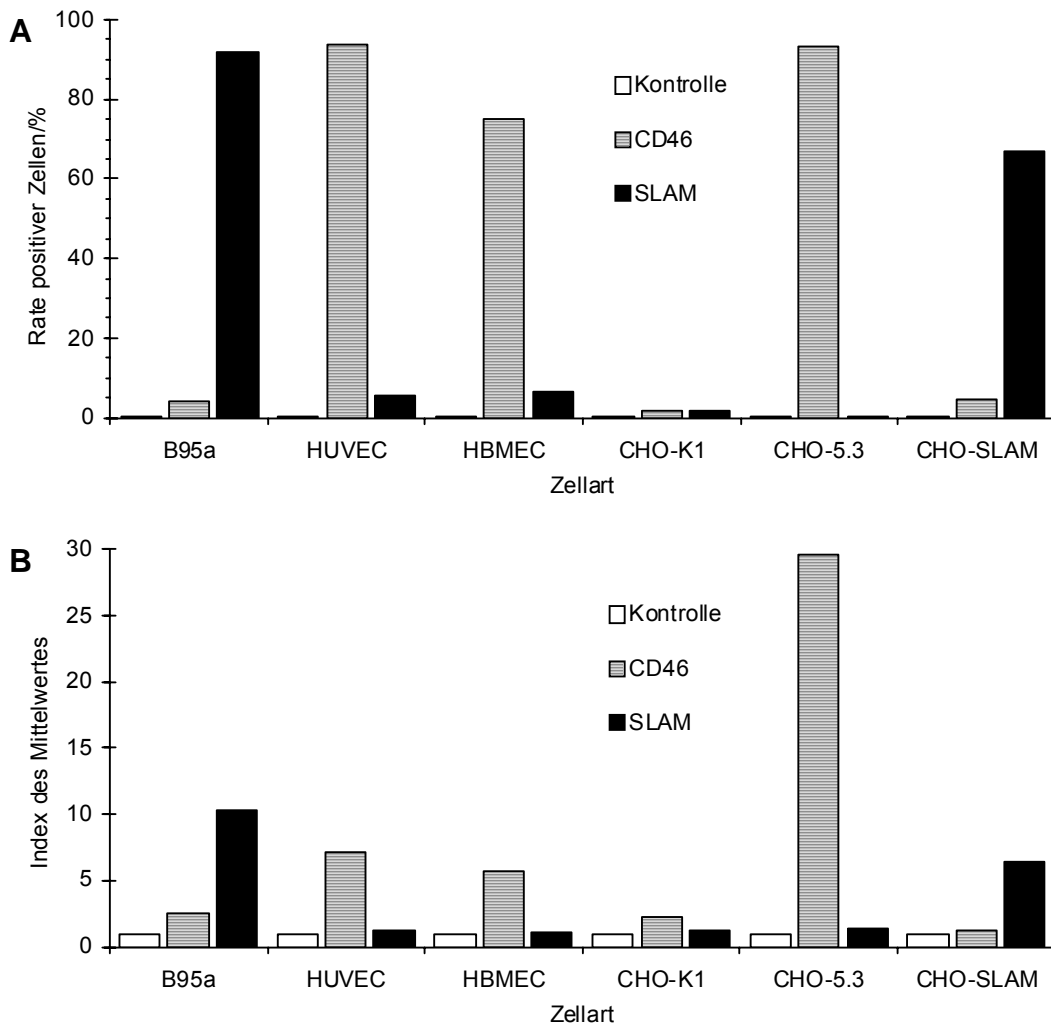


Abbildung 4.21: Übersicht über CD46- und SLAM-exprimierende Zellen.

Übersicht über die durchflusszytometrische Quantifizierung der Expression von CD46 und SLAM durch B95a-Zellen, HUVEC und HBMEC im Vergleich zu CHO-K1, CH-5.3 und CHO-SLAM unter Verwendung der CD46- und SLAM-spezifischen mAk 13/42 und 5C6. Dargestellt sind die Rate der fluoreszenzpositiven Zellen (A) und die Intensität des mittleren Fluoreszenzsignals als Index des Mittelwertes (B) gegenüber einer Isotypenkontrolle.

Ein starkes Fluoreszenzsignal für CD46 war von der Zelllinie CHO-5.3 zu erwarten, die humanes CD46 durch ein stabiles Plasmid an der Oberfläche präsentiert. Als Kontrolle für die Expression von humanem SLAM kam die Zelllinie CHO-SLAM zum Einsatz, die stabil mit der für SLAM kodierenden Sequenz transfiziert ist. Der positive Nachweis

der Masernvirusrezeptorexpression bei den verschiedenen CHO-Zellen war auch für ihre Verwendung bei den Infektionsuntersuchungen von elementarer Bedeutung.

Um auch gegebenenfalls intrazellulär gespeicherte Proteine nicht vom Nachweis durch die RT-PCR und FACS-Analyse auszunehmen, wurde der zelluläre Proteingehalt mittels Western-Blot-Analyse auf die Existenz der Masernvirusrezeptoren untersucht. Diese Methode ergab einen positiven Nachweis von CD46 bei HUVEC und HBMEC unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers 13/42. Nebenbefundlich fiel einerseits das Fehlen einer zweiten Bande, damit das Fehlen einer weiteren Isoform von CD46, und andererseits eine geringe, wenige kda umfassende Größendifferenz der bei HUVEC detektierten Isoform im Vergleich zu BJAB-Zellen und HBMEC auf. Nur bei BJAB-Zellen konnte die typische, diffuse, bei 70–90 kda lokalisierte Bande als Zeichen einer heterogenen Glykosylierung von SLAM nachgewiesen werden. Somit bot auch dieses Verfahren keinen Hinweis auf eine SLAM-Expression durch HUVEC oder HBMEC.

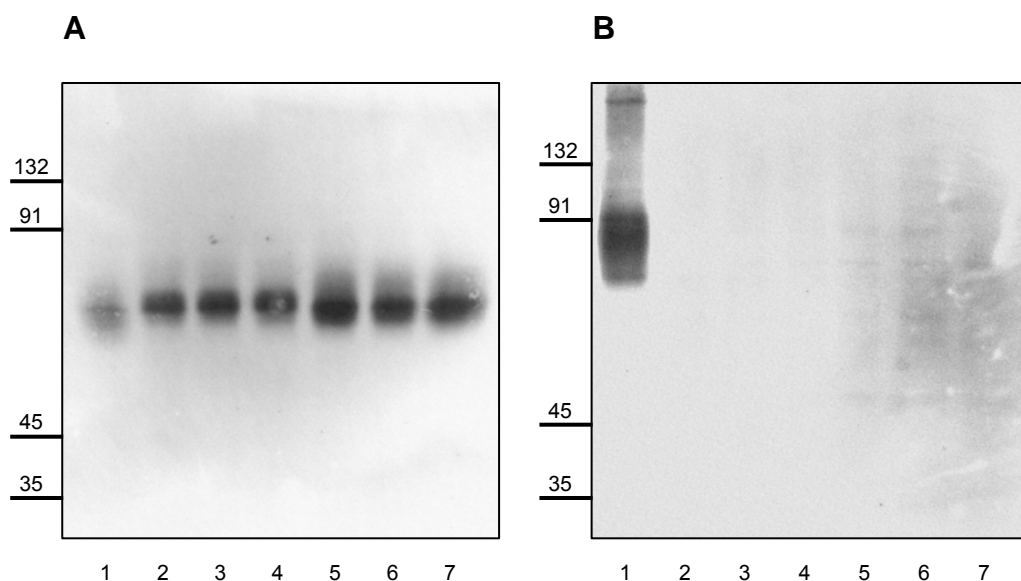


Abbildung 4.22: Expression von CD46 und SLAM durch BJAB-Zellen, HUVEC und HBMEC.

Western-Blot-Analyse der Expression von CD46 (A) und SLAM (B) durch BJAB-Zellen, HUVEC und HBMEC unter Verwendung der CD46- und SLAM-spezifischen mAk 13/42 und 5C6. Proteinbanden: CD46 ~67 kda, SLAM 70–90 kda. Spuren: BJAB-Zellen (1), HUVEC (2–4), HBMEC (5–7), ohne Stimulation (1, 2, 5), Stimulation mit IL-4 100 U/ml (3, 6) oder mit TNF- α 250 U/ml (4, 7) für 48 h.

4.3 Bindung von Masernviren an Endothelzellen

Ein erster elementarer Schritt für die Infektiosität von Masernviren ist ihre Bindung an die zellulären Rezeptoren der Zielzellen. Das Maß der Virusbindung kann als indirekter Indikator für die Präsenz von zellulären Rezeptoren an der Zelloberfläche dienen. Daher wurden die Bindungskapazitäten von Endothelzellen für den attenuierten Masernvirusstamm Edm und für einige Vertreter virulenter Masernvirusstämme unter Einsatz unterschiedlicher Virusmengen, angegeben als MOI, durchflusszytometrisch mittels eines gegen das Hämagglutininprotein des Masernvirus gerichteten Antikörper analysiert.

In Abbildung 4.23 sind die Ergebnisse der Bindungsversuche mit dem attenuierten Masernvirusstamm Edm und dem virulenten Masernvirusstamm WTFb an HUVEC in Abhängigkeit von ihrer Vorstimulation als Übersicht dargestellt. Eine hohe Bindungskapazität für Edm zeigten HUVEC schon bei geringen Mengen an eingesetztem Virus, die sich durch Erhöhung der eingesetzten Virusmengen noch einmal deutlich erhöhen ließ. Fast alle Zellen boten positive Fluoreszenzsignale. Die Bindungskapazität für den Wildtypstamm WTFb fiel im Vergleich zu Edm deutlich geringer aus, die Fluoreszenzsignale bewegten sich, abhängig von der eingesetzten Virusmenge, im Bereich des 2–4fachen gegenüber den Mockkontrollen. Die Stimulation der HUVEC 42 h vor den Messungen mit TNF- α oder IFN- γ hatte keinen Einfluss auf die Bindungskapazität für WTFb, die Intensität der Fluoreszenzsignale bei der Analyse der Bindungskapazität für Edm fiel bei gleichen Messbedingungen nach Stimulation mit TNF- α etwas, mit IFN- γ um das 2–3fache deutlich geringer aus.

Die Ergebnisse umfangreicher Messungen der Bindungskapazitäten von HUVEC und HBMEC für Edm und WTFb sowie die weiteren virulenten Masernvirusstämme Wü4797, Wü5679 und Wü7671 sind in Abbildungen 4.24 und 4.25 verdeutlicht. Die Bindungskapazität für Edm war bei beiden Endothelzellarten sehr hoch, die Intensität der Fluoreszenzsignale korrelierte dabei jeweils sehr gut mit der eingesetzten Virusmenge. Die Rate der fluoreszenzpositiven Zellen fiel durch die sich überschneidende Unterteilung in fluoreszenzpositive und -negative Zellen bei HUVEC geringer aus als bei HBMEC und lag bei beiden Zellarten unter der zuvor gemessenen Rate. Anhand der

klar nach rechts verschobenen Histogrammkurven ließ sich allerdings eine Bindung von Edm an nahezu alle HUVEC und HBMEC abschätzen.

Hinsichtlich der Bindungskapazität von HUVEC und HBMEC für Wildtypstämme offenbarte sich ein heterogenes Bild. Für WTFb und Wü5679 lag die Bindungskapazität auf niedrigem Niveau bis zur 8fachen Intensität der Mockkontrolle, bis zu 13 % der HUVEC und 20 % der HBMEC wiesen positive Fluoreszenzsignale auf. Positive Fluoreszenzsignale wurden für Wü4797, abhängig von der eingesetzten Virusmenge, bei bis zu 41 % der HUVEC und 56 % der HBMEC festgestellt, für Wü7671 waren es noch bis zu 30 % der Endothelzellen. In Anbetracht des zweigipfligen Verlaufs der Histogrammkurven schien es sich dabei um Subpopulationen zu handeln, auf die der Hauptteil der Bindungskapazität fiel.

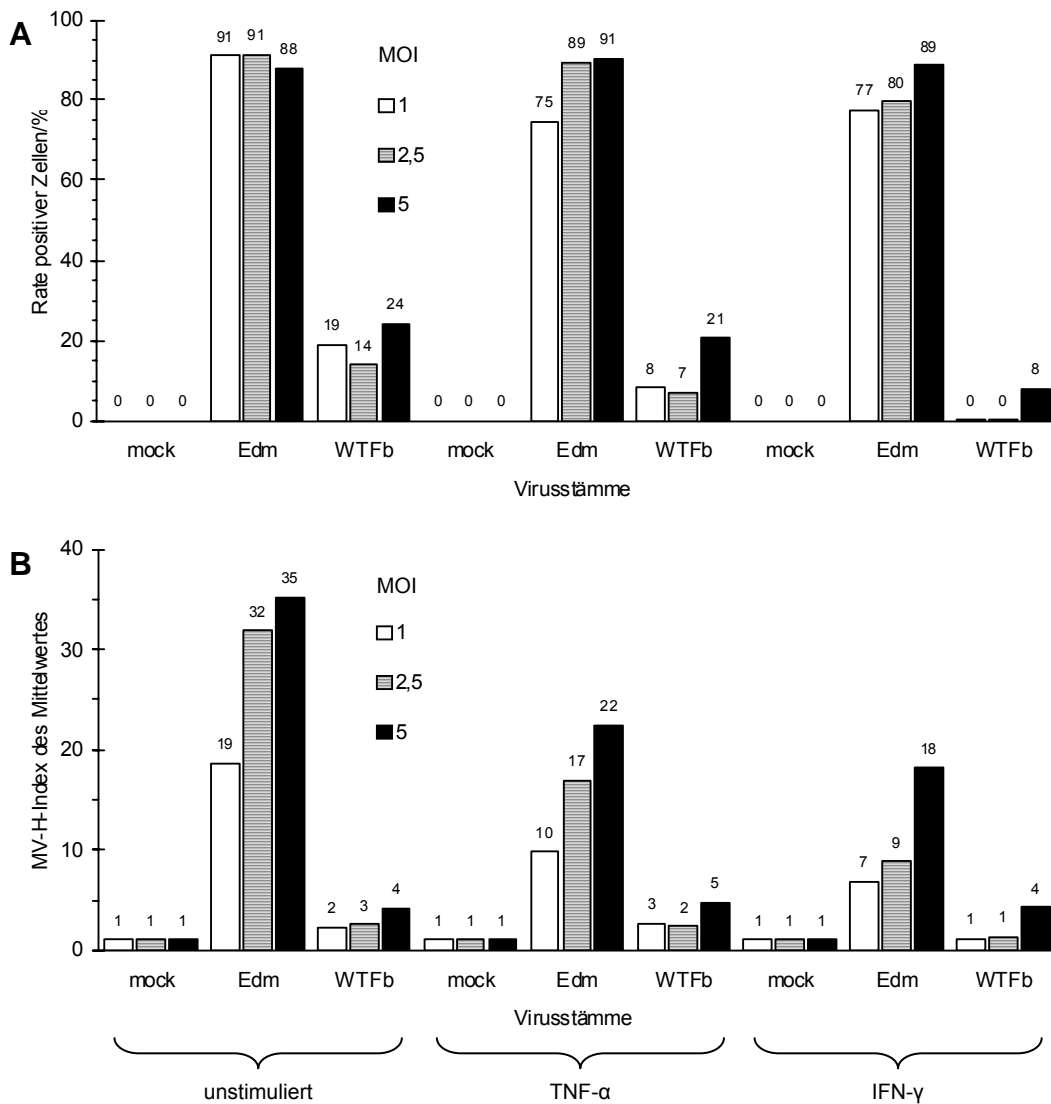


Abbildung 4.23: Übersicht über die Masernvirusbindung an native und stimulierte HUVEC.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der Bindung der Masernvirusstämme Edm und WTFb an unbehandelte sowie mit TNF- α 200 U/ml oder IFN- γ 1.000 U/ml über 42 h stimulierte HUVEC bei unterschiedlichen MOI, bei einer Temperatur von 37 °C und unter Verwendung des MV-H-spezifischen mAkl77. Dargestellt sind die Rate der fluoreszenzpositiven Zellen (A) und die Intensität des mittleren Fluoreszenzsignals als Index des Mittelwertes (B) gegenüber entsprechenden Mockkontrollen.

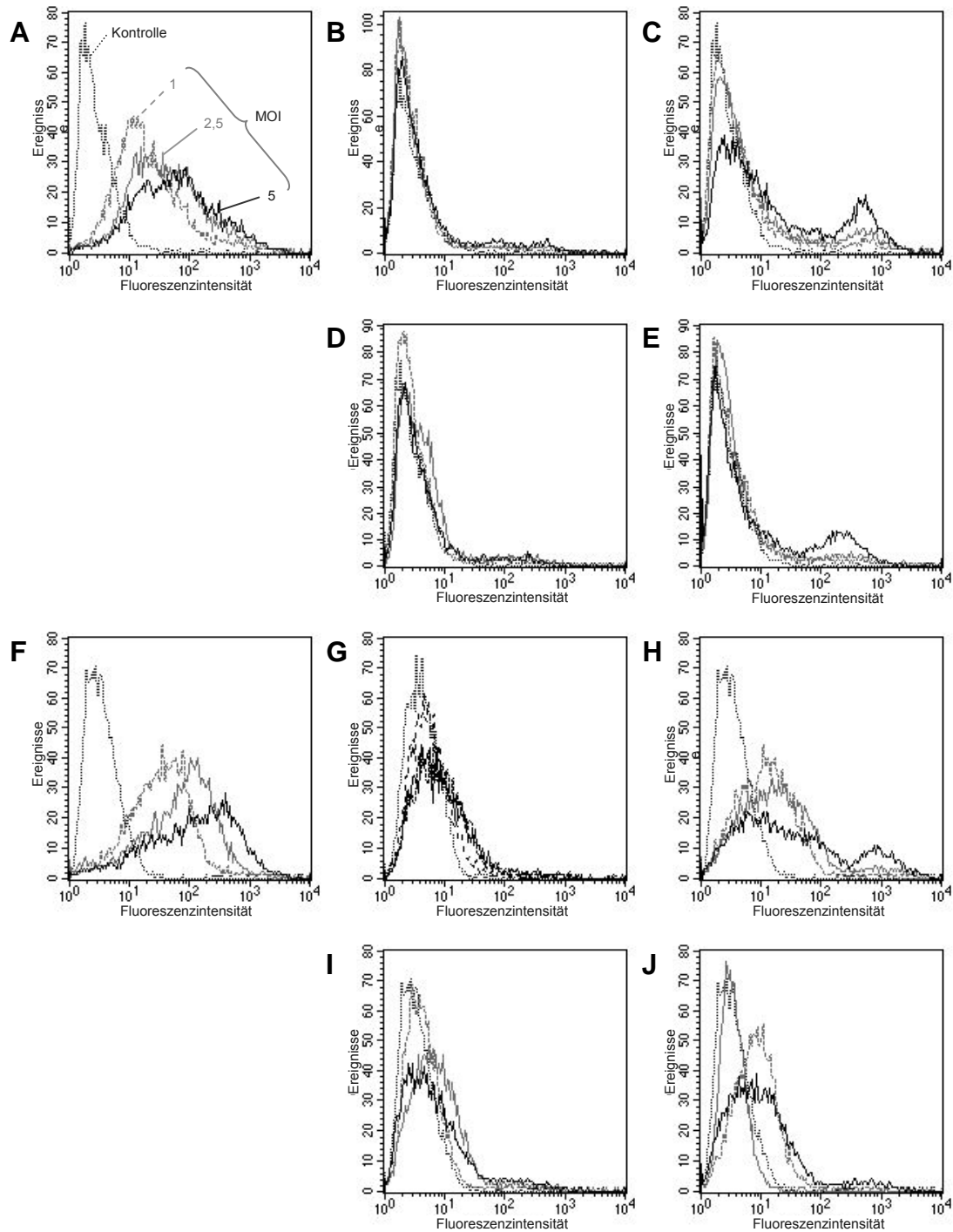


Abbildung 4.24: Analyse der Masernvirusbindung an HUVEC und HBMEC.

FACS-Analyse der Bindung der Masernvirusstämme Edm (A, F), WTFb (B, G), Wü4797 (C,H), Wü5679 (D, I) und Wü7671 (E, J) an HUVEC (A–E) und HBMEC (F–J) bei unterschiedlichen MOI, bei einer Temperatur von 37 °C und unter Verwendung des MV-H-spezifischen mAk K83 gegenüber entsprechenden Mockkontrollen. Beschriftung s. (A).

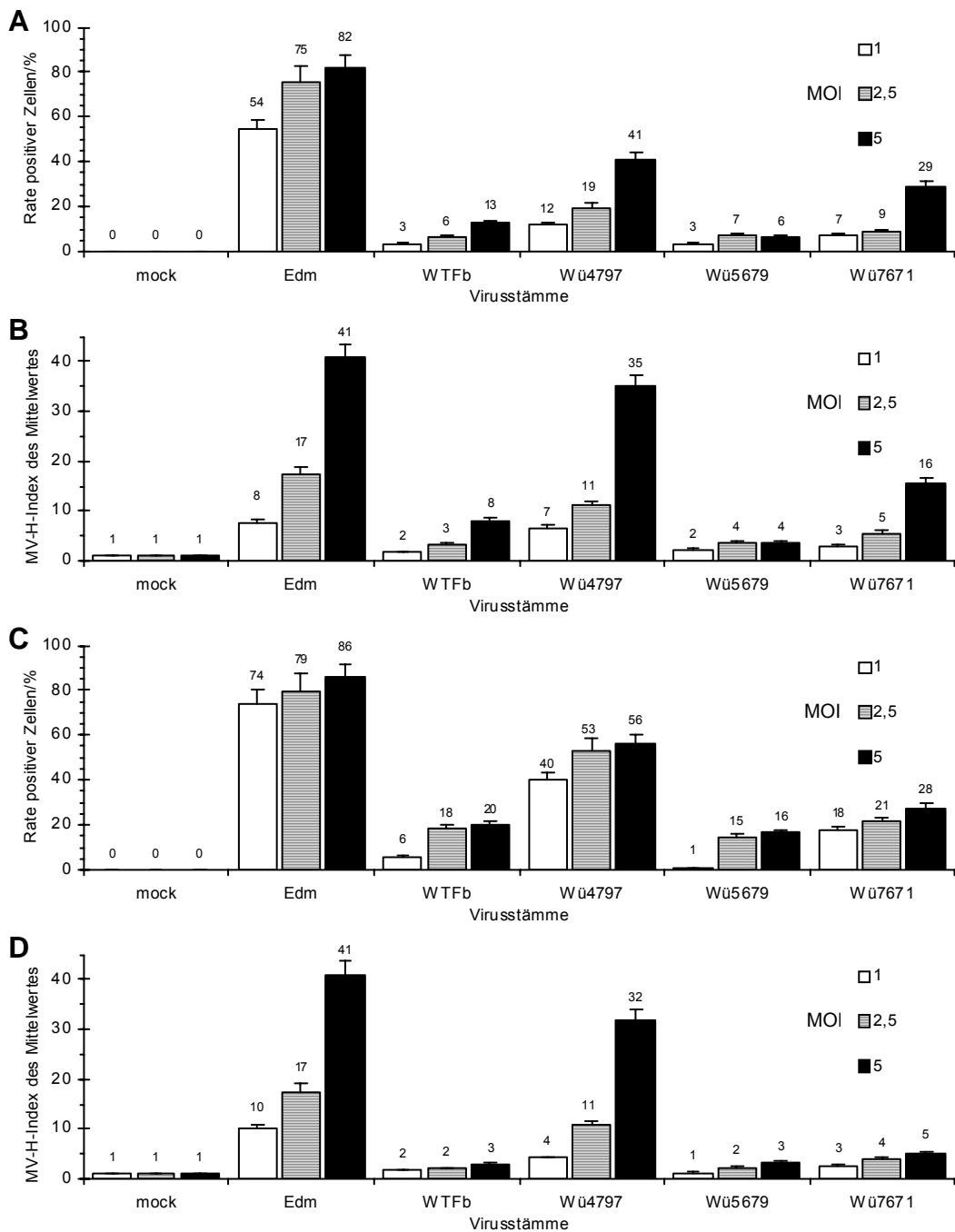


Abbildung 4.25: Übersicht über die Masernvirusbindung an HUVEC und HBMEC.

Durchflusszytometrische Quantifizierung der Bindung der Masernvirusstämme Edm, WTFb, Wü4797, Wü5679 und Wü7671 an HUVEC (A, B) und HBMEC (C, D) bei unterschiedlichen MOI, bei einer Temperatur von 37 °C und unter Verwendung des MV-H-spezifischen mAk K83. Dargestellt sind die Rate der fluoreszenzpositiven Zellen (A, C) und die Intensität des mittleren Fluoreszenzsignals als Index des Mittelwertes (B, D) gegenüber entsprechenden Mockkontrollen.

4.4 Infektion von Endothelzellen mit Masernviren

4.4.1 Mikroskopische Darstellung der Masernvirusinfektion

Zur Analyse und zum Nachweis der Infektion von humanen vaskulären Endothelzellen mit verschiedenen Masernvirusstämmen wurden verschiedene Ansätze gewählt. Die Auswirkung einer Masernvirusinfektion auf die Zellmorphologie wurde phasenkontrastmikroskopisch beurteilt, das Ausmaß, die Ausbreitung und die Intensität einer Masernvirusinfektion wurden neben Kontrolluntersuchungen mit anderen permissiven Zellarten unter Einsatz der indirekten Immunfluoreszenz mikroskopisch visualisiert und durchflusszytometrisch quantifiziert. Schließlich wurden die Replikation und Produktion von Masernviren innerhalb der Zellkultur mittels der Endpunkttitration bestimmt.

Zunächst wurden das Ausmaß, die Ausbreitung und die Intensität einer Masernvirusinfektion innerhalb einer Kultur von HUVEC und HBMEC mit dem attenuierten Masernvirusstamm Edm und den virulenten Masernvirusstämmen WTFb, Wü4797 und Wü5679 bei verschiedenen MOI über 3 d untersucht und phasenkontrast- sowie immunfluoreszenzmikroskopisch analysiert. Zur immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion einer Masernvirusinfektion wurde das intrazellulär reichlich replizierte Nukleokapsidprotein unter Verwendung des spezifischen, monoklonalen Primärantikörpers F227 und des Alexa Fluor[®] 488-gekoppelten Sekundärantikörpers ausgewählt.

In Abbildung 4.26 sind HUVEC phasenkontrastmikroskopisch dargestellt, die entweder uninfiziert belassen oder mit den Masernvirusstämmen Edm, WTFb, Wü4797 und Wü5679 über bis zu 3 d infiziert worden waren. In vor allem mit Edm, aber auch mit virulenten Masernvirusstämmen infizierten Kulturen konnten zytopathische Effekte in Form von Synzytienbildung schon nach 24 h beobachtet werden, einige Areale des mit Edm infizierten Monolayer waren nach 72 h lysiert. Auffällig bei einer großen Zahl von HUVEC war in besonders mit WTFb und Wü5679 infizierten Kulturen eine Veränderung der Morphologie von einem polygonalen, konfluenten und pflastersteinartigen hin zu einem länglichen, fast spindelförmigen Zellbild.

Der hellfeldmikroskopischen Begutachtung steht die immunfluoreszenzmikroskopische Masernvirusdetektion in Abbildung 4.27 gegenüber. In der Reihe der unbe-

handelten Zellen ließ sich erwartungsgemäß kein Nukleokapsidprotein nachweisen. Die Masernvirusinfektion verbreitete sich sehr effizient in mit Edm infizierten Kulturen unter Bildung von zytopathischen Effekten. Eine ähnliche Beobachtung galt auch für den virulenten Stamm Wü4797, der sich unter Bildung von zytopathischen Effekten nach 72 h ebenfalls in einem großen Anteil der Zellen nachweisen ließ. Etwas verhaltener gestaltete sich die Ausbreitung der Infektion von HUVEC mit den beiden virulenten Stämmen WTFb und Wü5679, eine Infektion der Zellen war aber eindeutig festzustellen.

Bei gleichen Untersuchungsbedingungen zeigte die Infektion von HBMEC mit den vier verschiedenen Masernvirusstämmen ein ähnliches, in einigen Punkten allerdings unterschiedliches Infektionsmuster, das in den Abbildungen 4.28 und 4.29 dargestellt ist. Nach der Infektion mit Edm offenbarten HBMEC von Beginn an eine deutlich stärkere Tendenz zur Synzytienbildung als HUVEC, die Infektion von HBMEC mit den virulenten Stämmen WTFb, Wü4797 und Wü5679 ergab ein im Vergleich zu HUVEC geringeres Ausmaß von Synzytienbildung und zellmorphologischer Alteration. Immunfluoreszenzmikroskopisch konnten die phasenkontrastmikroskopisch gewonnenen Eindrücke bestätigt werden. Unter klarer Bildung von Synzytien ließ sich bei Edm ein sehr hoher Anteil von infizierten HBMEC darstellen, während das Ausmaß der nachgewiesenen Infektion von HBMEC mit den virulenten Stämmen offensichtlich gering, aber positiv ausfiel. Interessant war die Beobachtung, dass vermeintlich eher die erhaben liegenden oder oberflächlichen Zellen infiziert zu sein schienen.

In Ergänzung zu den Untersuchungen der Kinetik der Infektion von HUVEC und HBMEC mit den verschiedenen Masernvirusstämmen wurden, allerdings ohne Einsatz des virulenten Masernvirusstamms Wü4797, parallele Untersuchungsreihen bei einer fünffach höheren MOI von 0,5 durchgeführt, die in den Abbildungen 4.30 bis 4.33 aufgeführt sind. Die Infektion von HUVEC wie auch HBMEC mit Edm ging in ansteigendem Maß schon nach 48 h mit einer ausgeprägten Synzytienbildung und Zelllyse einher, so dass sich nach 72 h große Lücken im Zellmonolayer gebildet hatten und nur noch scheinbar eher weniger infizierte Areale zurückgeblieben, aber morphologisch alteriert aufzufinden waren. Eine effiziente Infektion von HUVEC boten auch die beiden virulenten Masernvirusstämme WTFb und Wü5679, so zeigte sich ein größerer Anteil zyto-

pathischer Effekte innerhalb des Zellmonolayers, verbunden mit einer morphologischen Veränderung vieler übriger Zellen.

Auch immunfluoreszenzmikroskopisch war die Beobachtung einer stärkeren Infektion von HUVEC und HBMEC als bei Einsatz der geringeren MOI nachzuvollziehen. Nach der Infektion beider Endothelzellarten mit Edm war eine ausgeprägte Synzytienbildung mit reichlich exprimiertem Nukleokapsidprotein nachweisbar. Auch die beiden Vertreter der Wildtypstämme WTFb und Wü5679 verursachten eine recht ausgiebige Infektion von HUVEC und HBMEC, dabei schien sich erneut eine deutlich stärkere und schnellere oder effizientere Infektion von HUVEC als von HBMEC zu zeigen. Die Infektion von HUVEC mit Wü5679 zeigte einige gut durchinfizierte Areale mit einer auffällig körnigen, intrazytoplasmatischen Verteilung des Nukleokapsidproteins ohne Tendenz zur Synzytienbildung. Diese Variante einer Nukleokapsidverteilung konnte im Rahmen dieser wissenschaftlichen Arbeit so noch nicht beobachtet werden.

Abbildung 4.34 zeigt eine weitere, eher zufällig beobachtete Auffälligkeit der Infektion von HUVEC mit Wü4797. Vor der routinemäßigen Kernfärbung mit dem DNA-interkalierenden Fluoreszenzfarbstoff DAPI wurde in einem Versuch entdeckt, dass nach Ablauf von 138 h nach der Infektion mit Wü4797 in einer Kultur von HUVEC das virale Nukleokapsidprotein intranukleär angereichert wurde, eine Beobachtung, die nach der Infektion der gleichen Zellen unter gleichen Bedingungen mit Edm und WTFb nicht gemacht worden war. In Abbildungen 4.35 und 4.36 ist beispielhaft die Bildung von Synzytien nach Infektion von HUVEC und HBMEC mit verschiedenen Masernvirusstämmen phasenkontrast- und immunfluoreszenzmikroskopisch aufgezeigt. Dabei wiesen HBMEC nach ihrer Infektion mit Edm eine stärkere Tendenz zur Synzytienbildung als HUVEC auf, zusätzlich beinhalteten die Synzytien hier eine größere Zahl von Zellen. Nach Infektion der Zellen mit dem virulenten Masernvirusstamm Wü4797 konnten Synzytien nachgewiesen werden, die jedoch kleiner und weniger zahlreich als bei einer Infektion mit Edm waren. Nur gelegentlich konnten einzelne, bis zu 18 Zellkerne umfassende Synzytien detektiert werden. Auch nach der Infektion von HUVEC mit Wü5679 kam die Bildung von Synzytien vor, die erwartungsgemäß bei einer MOI von 0,5 stärker ausgeprägt zu sein schien. Abbildung 4.37 zeigt Nahaufnahmen von infizierten HBMEC, die lange, dünne filiforme Ausläufer ausbildeten.

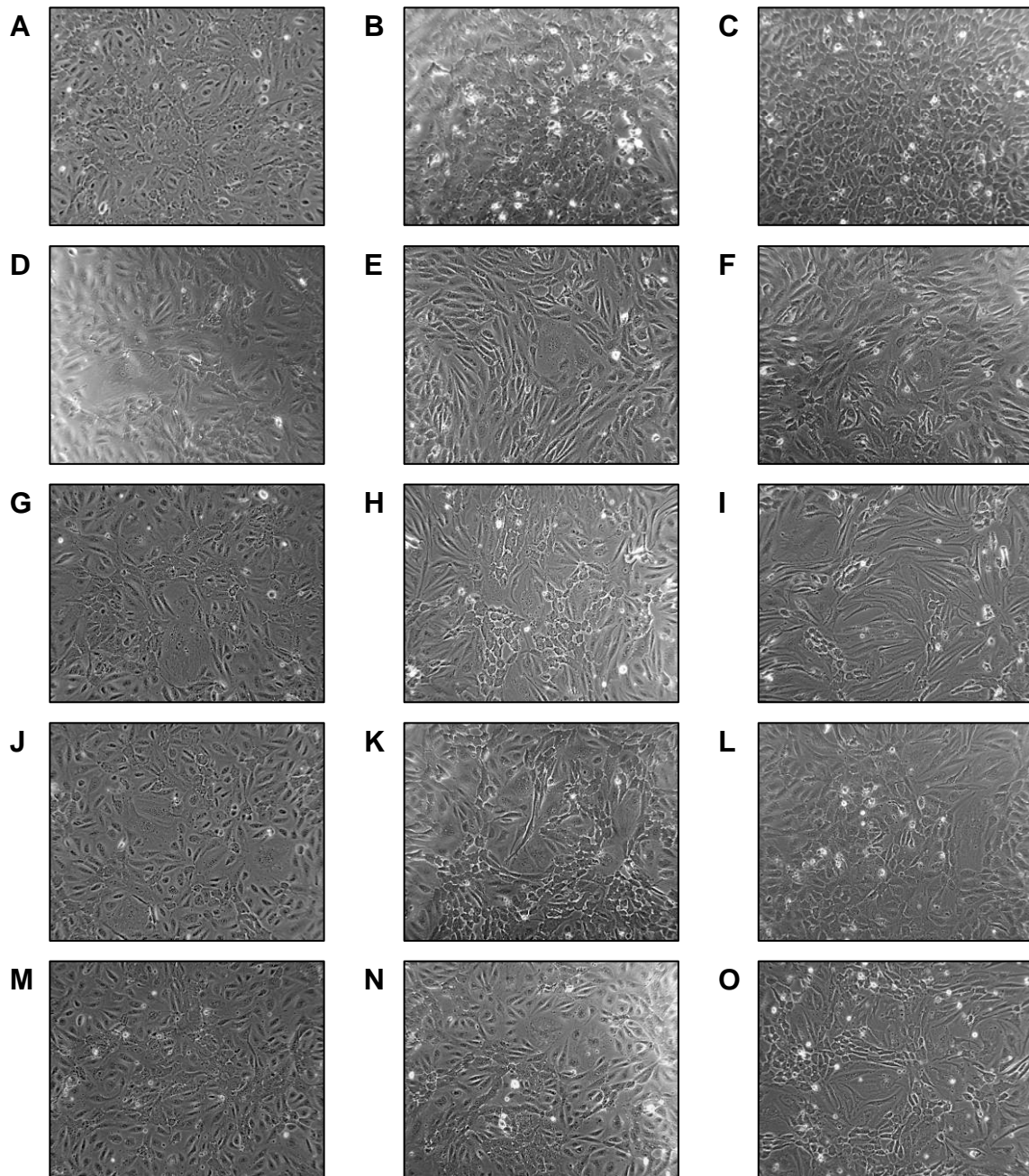


Abbildung 4.26: Morphologie von infizierten HUVEC bei einer MOI von 0,1.

Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Infektion von HUVEC mit Edm (D–F), WTFb (G–I), Wü4797 (J–L) und Wü5679 (M–O) 24 h (A, D, G, J, M), 48 h (B, E, H, K, N) und 72 h (C, F, I, L, O) nach Infektionsbeginn bei einer MOI von 0,1. Zum Vergleich sind uninfizierte HUVEC abgebildet (A–C). Vergrößerung 125x.

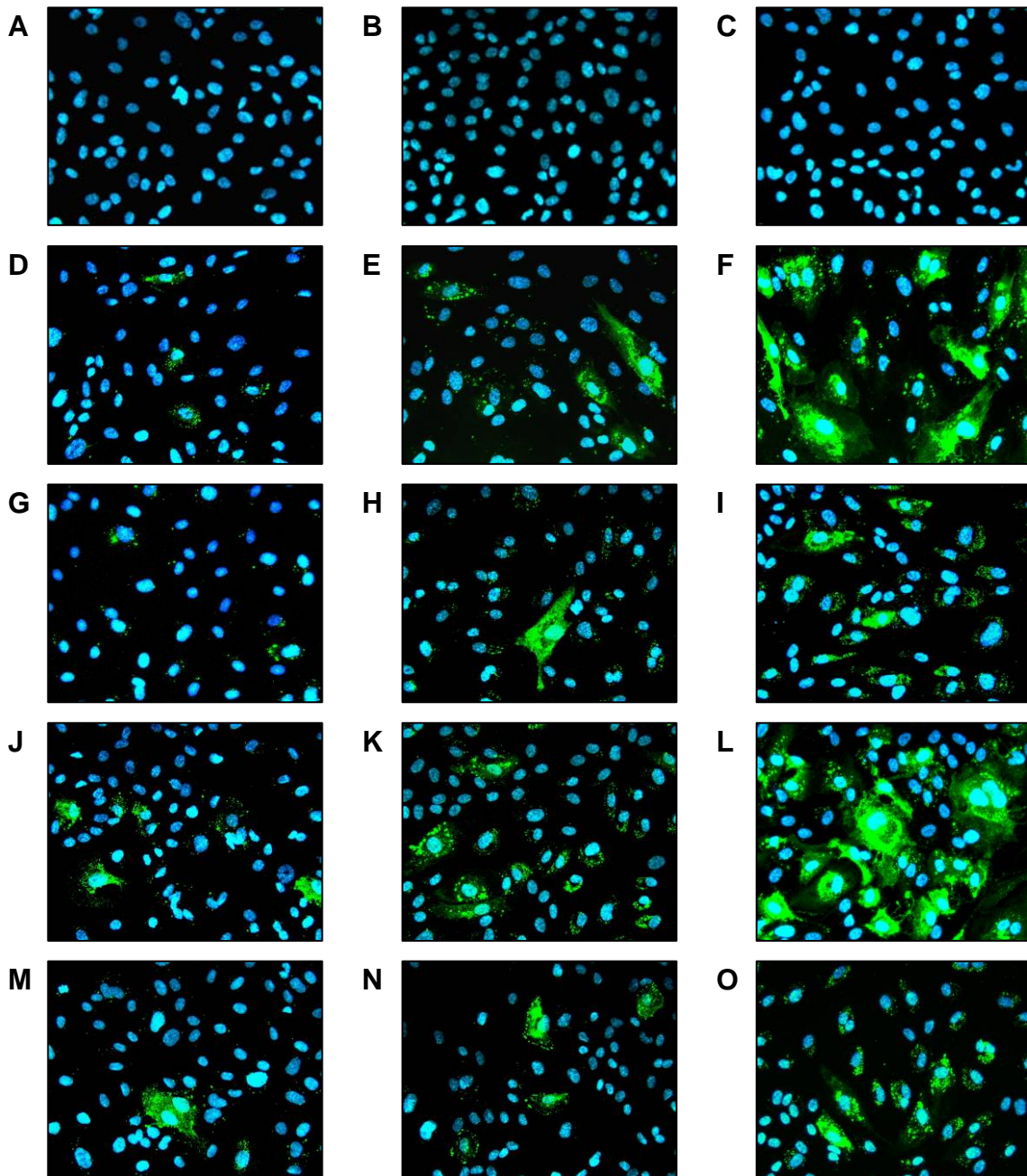


Abbildung 4.27: Ausbreitung einer Masernvirusinfektion bei HUVEC und einer MOI von 0,1.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Ausbreitung einer Infektion von HUVEC mit Edm (D–F), WTFb (G–I), Wü4797 (J–L) und Wü5679 (M–O) 24 h (A, D, G, J, M), 48 h (B, E, H, K, N) und 72 h (C, F, I, L, O) nach Infektionsbeginn bei einer MOI von 0,1 unter Verwendung des MV-N-spezifischen mAk F227 (grün). Zum Vergleich sind uninfizierte HUVEC abgebildet (A–C). Die Zellkerne (blau) sind mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt worden. Vergrößerung 250x.

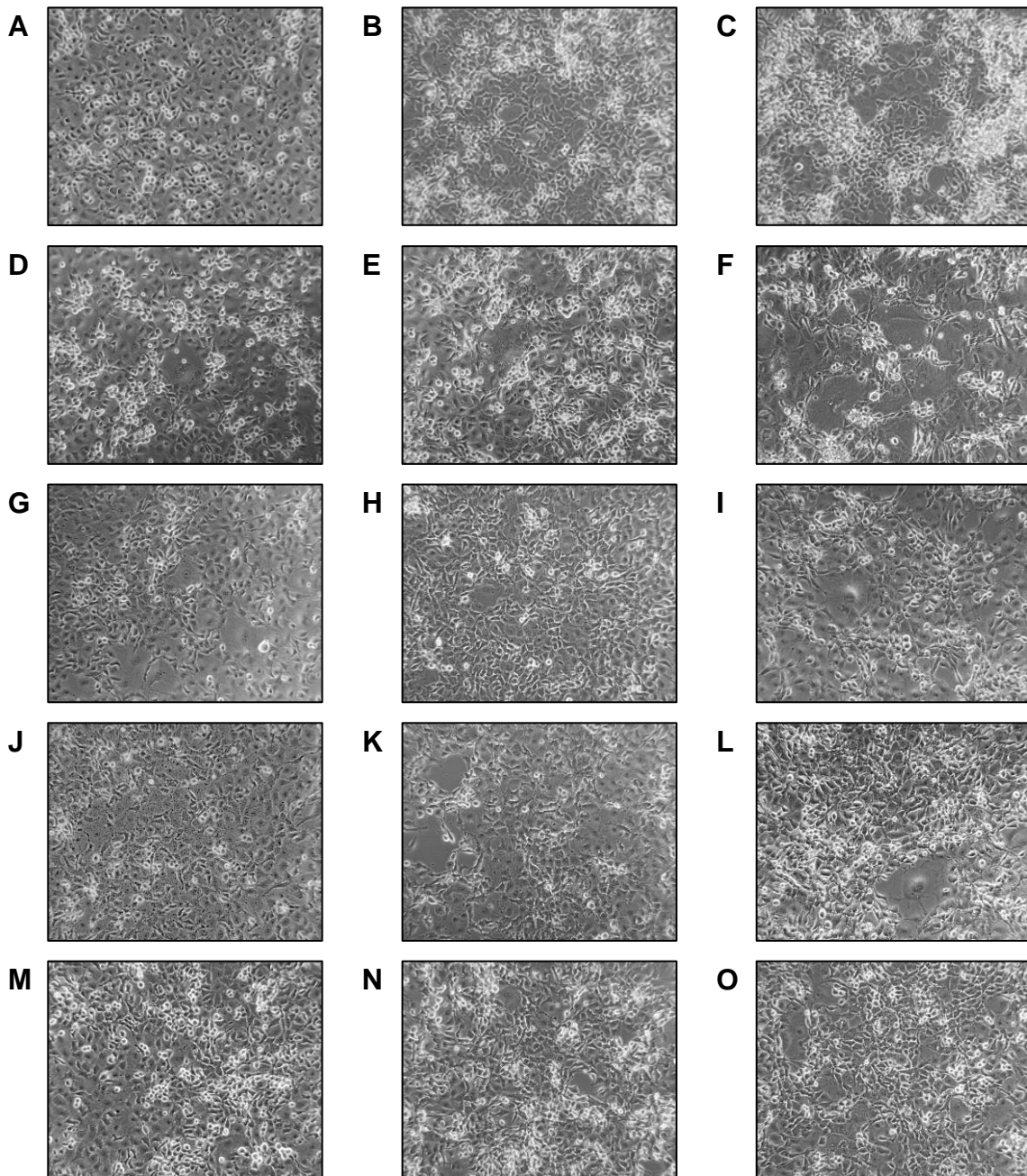


Abbildung 4.28: Morphologie von infizierten HBMEC bei einer MOI von 0,1.

Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Infektion von HBMEC mit Edm (D–F), WTFb (G–I), Wü4797 (J–L) und Wü5679 (M–O) 24 h (A, D, G, J, M), 48 h (B, E, H, K, N) und 72 h (C, F, I, L, O) nach Infektionsbeginn bei einer MOI von 0,1. Zum Vergleich sind uninfizierte HBMEC abgebildet (A–C). Vergrößerung 125x.

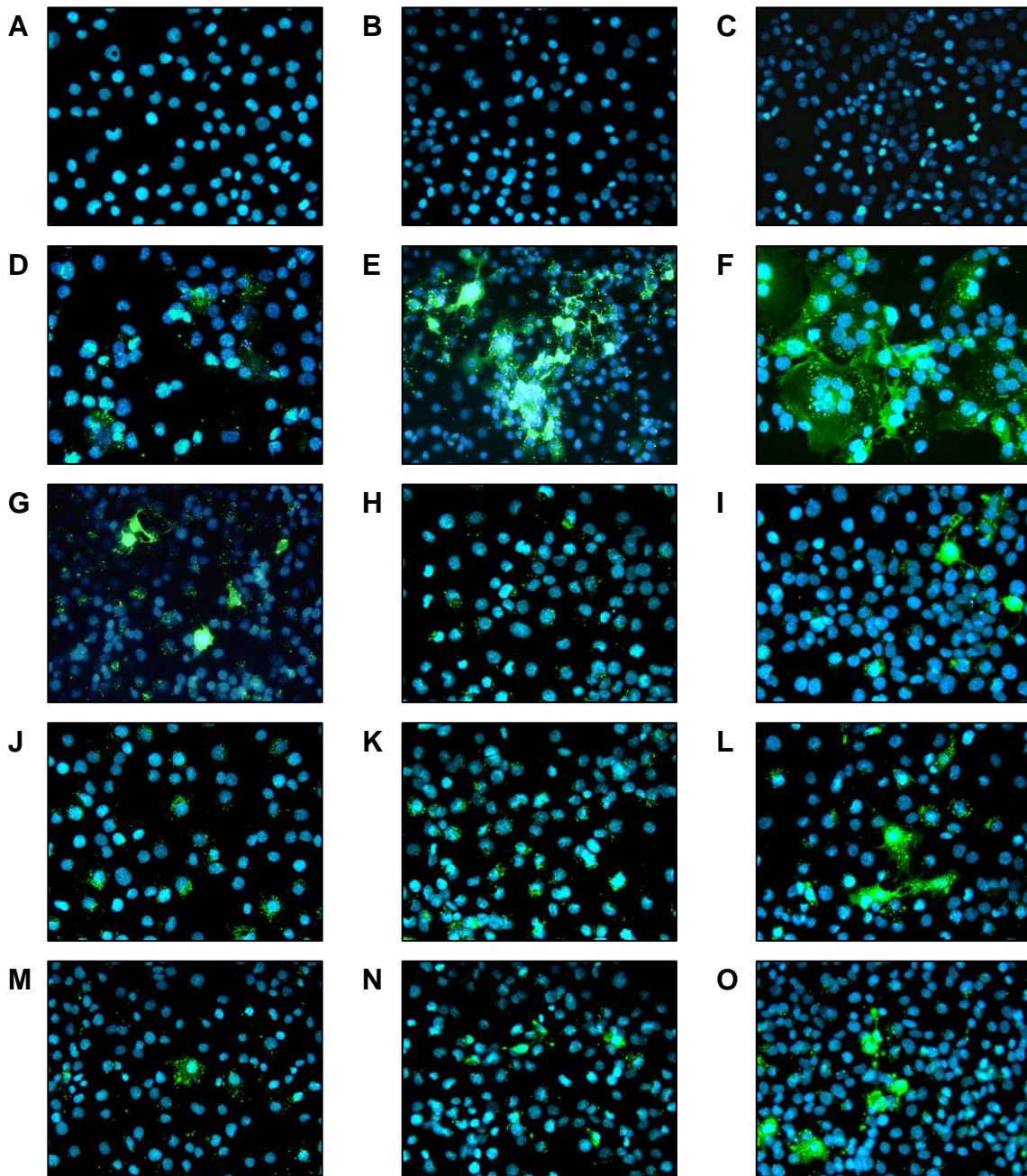


Abbildung 4.29: Ausbreitung einer Masernvirusinfektion bei HBMEC und einer MOI von 0,1.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Ausbreitung einer Infektion von HBMEC mit Edm (D–F), WTFb (G–I), Wü4797 (J–L) und Wü5679 (M–O) 24 h (A, D, G, J, M), 48 h (B, E, H, K, N) und 72 h (C, F, I, L, O) nach Infektionsbeginn bei einer MOI von 0,1 unter Verwendung des MV-N-spezifischen mAb F227 (grün). Zum Vergleich sind uninfizierte HBMEC abgebildet (A–C). Die Zellkerne (blau) sind mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt worden. Vergrößerung 250x.

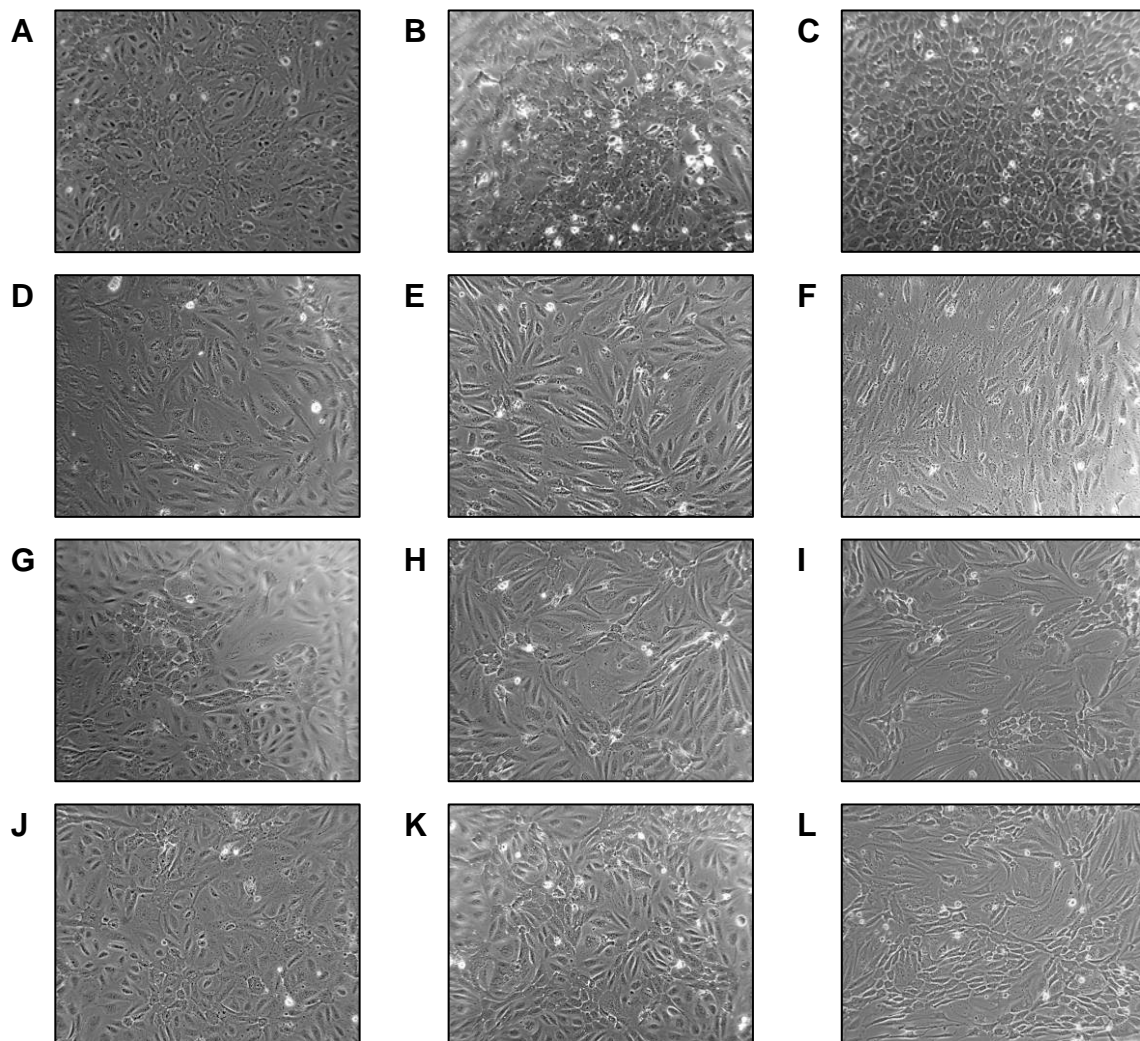


Abbildung 4.30: Morphologie von infizierten HUVEC bei einer MOI von 0,5.

Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Infektion von HUVEC mit Edm (D–F), WTFb (G–I) und Wü5679 (J–L) 24 h (A, D, G, J), 48 h (B, E, H, K) und 72 h (C, F, I, L) nach Infektionsbeginn bei einer MOI von 0,5. Zum Vergleich sind uninfizierte HUVEC abgebildet (A–C). Vergrößerung 125x.

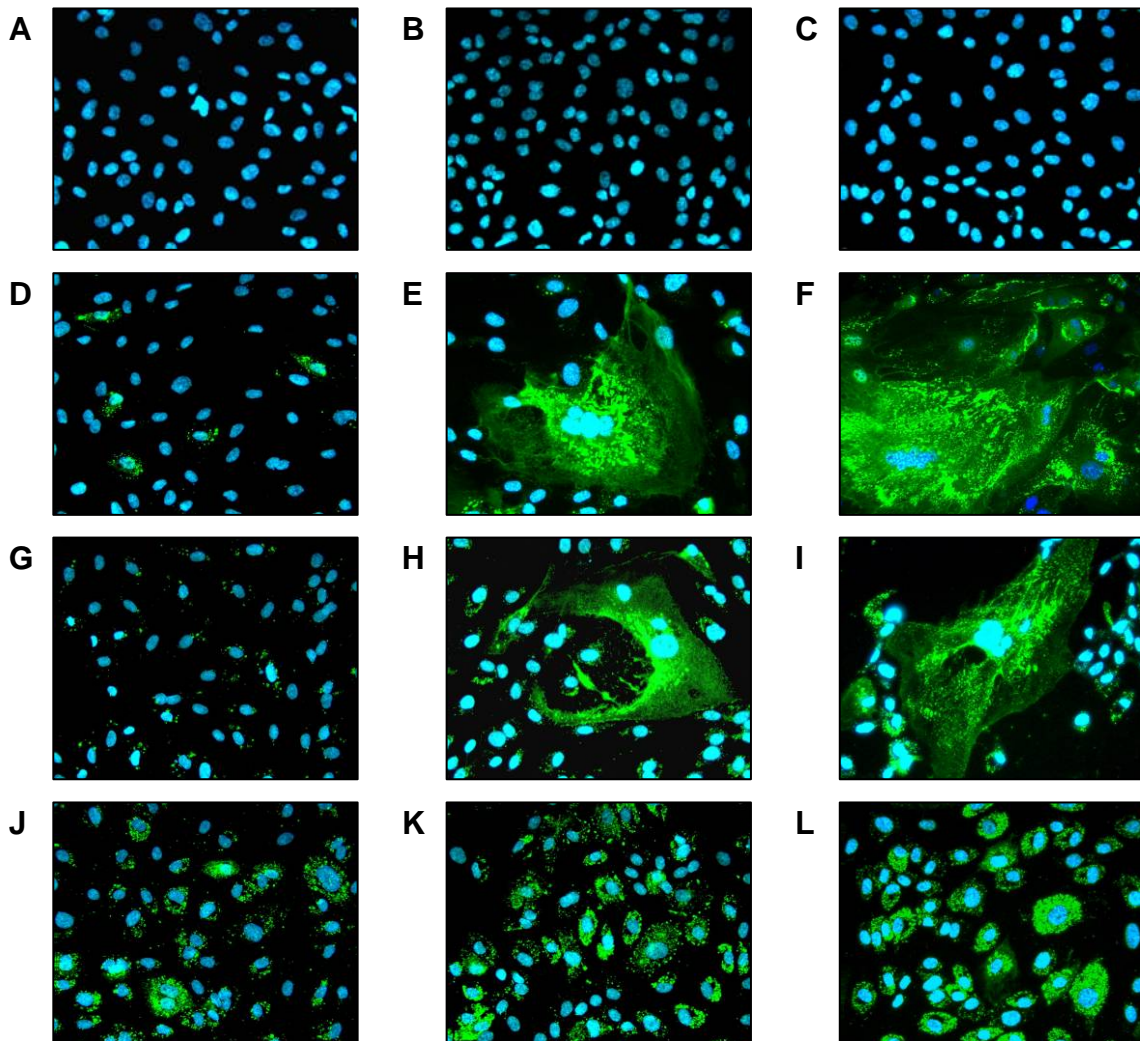


Abbildung 4.31: Ausbreitung einer Masernvirusinfektion bei HUVEC und einer MOI von 0,5.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Ausbreitung einer Infektion von HUVEC mit Edm (D–F), WTFb (G–I) und Wü5679 (J–L) 24 h (A, D, G, J), 48 h (B, E, H, K) und 72 h (C, F, I, L) nach Infektionsbeginn bei einer MOI von 0,5 unter Verwendung des MV-N-spezifischen mAk F227 (grün). Zum Vergleich sind uninfizierte HUVEC abgebildet (A–C). Die Zellkerne (blau) sind mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt worden. Vergrößerung 250x.

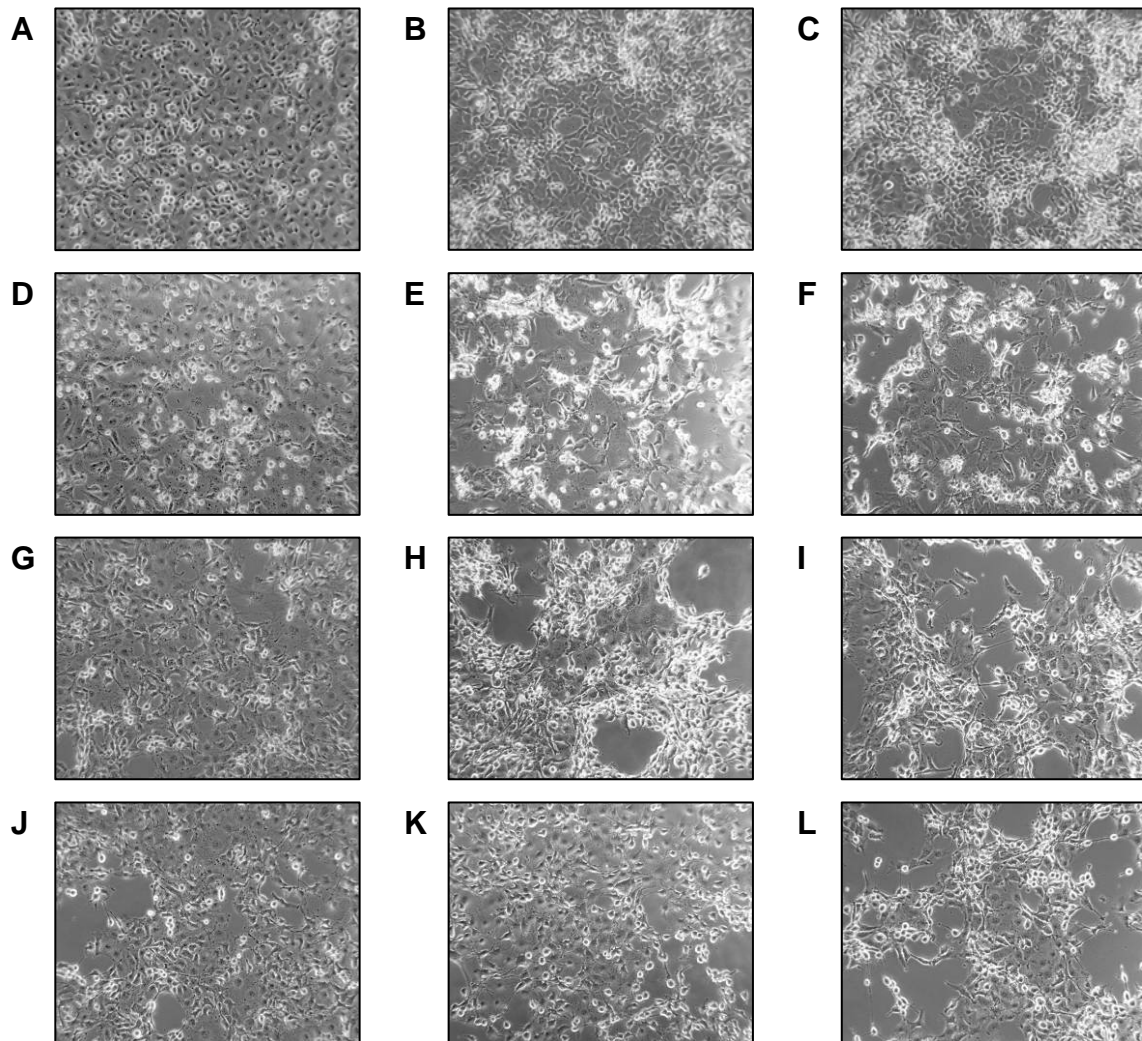


Abbildung 4.32: Morphologie von infizierten HBMEC bei einer MOI von 0,5.

Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Infektion von HBMEC mit Edm (D–F), WTFb (G–I) und Wü5679 (J–L) 24 h (A, D, G, J), 48 h (B, E, H, K) und 72 h (C, F, I, L) nach Infektionsbeginn bei einer MOI von 0,5. Zum Vergleich sind uninfizierte HBMEC abgebildet (A–C). Vergrößerung 125x.

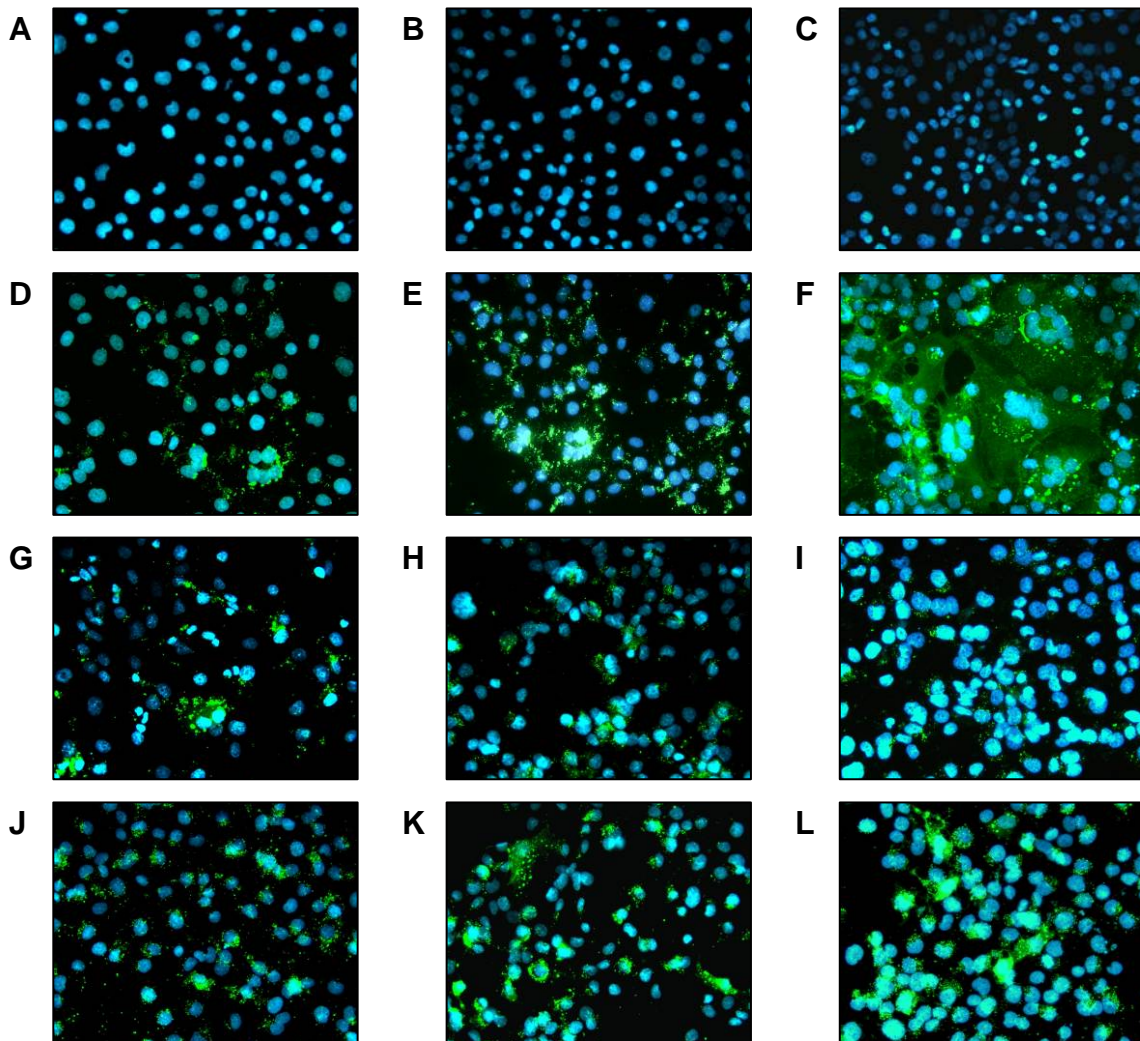


Abbildung 4.33: Ausbreitung einer Masernvirusinfektion bei HBMEC und einer MOI von 0,5.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Ausbreitung einer Infektion von HBMEC mit Edm (D–F), WTFb (G–I) und Wü5679 (J–L) bei einer MOI von 0,5 in einem Zeitraum von 24 h (A, D, G, J), 48 h (B, E, H, K) und 72 h (C, F, I, L) nach Infektionsbeginn unter Verwendung des MV-N-spezifischen mAk F227 (grün). Zum Vergleich sind uninfizierte HBMEC abgebildet (A–C). Die Zellkerne (blau) sind mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt worden. Vergrößerung 250x.

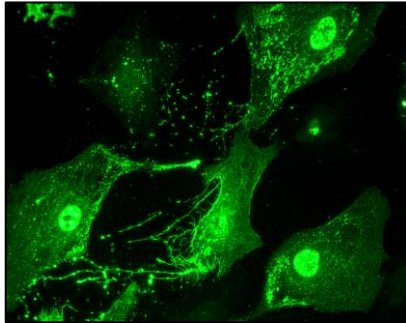


Abbildung 4.34: Intranukleäre Anreicherung des Nukleokapsidproteins bei infizierten HUVEC.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der intranukleären Anreicherung des Nukleokapsidproteins bei HUVEC 138 h nach der Infektion mit Wü4797 bei einer MOI von 0,01 unter Verwendung des MV-N-spezifischen mAk F227 (grün). Vergrößerung 400x.

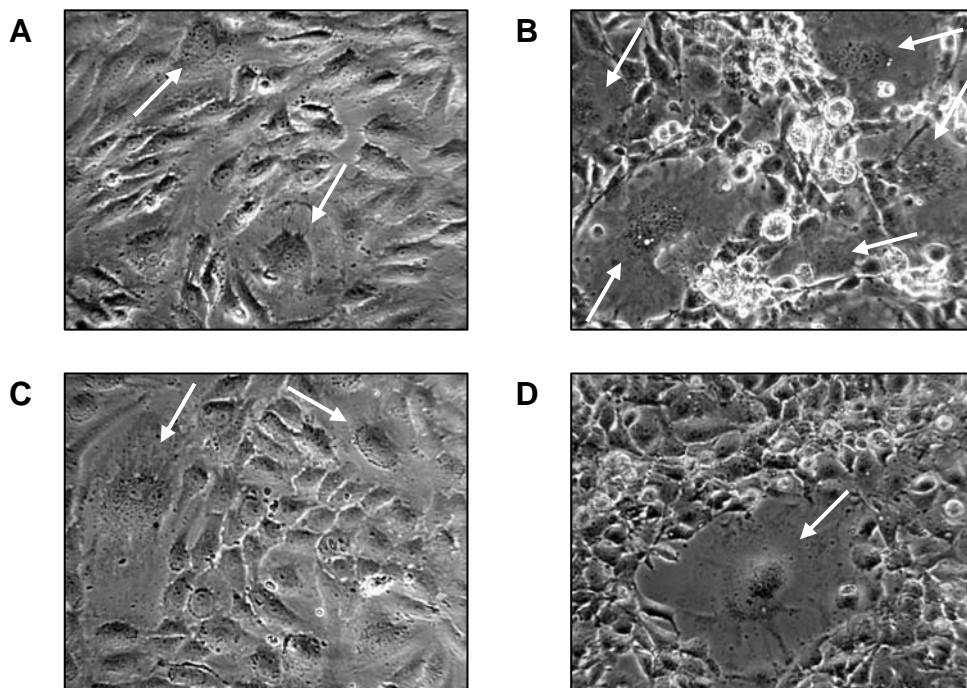


Abbildung 4.35: Synzytienbildung bei infizierten HUVEC und HBMEC.

Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der Synzytienbildung (Pfeile) mindestens dreier Zellen bei HUVEC (A, C) und HBMEC (B, D) 3 d nach der Infektion mit Edm (A, B) und Wü4797 (C, D) bei einer MOI von 0,1. Vergrößerung 250x.

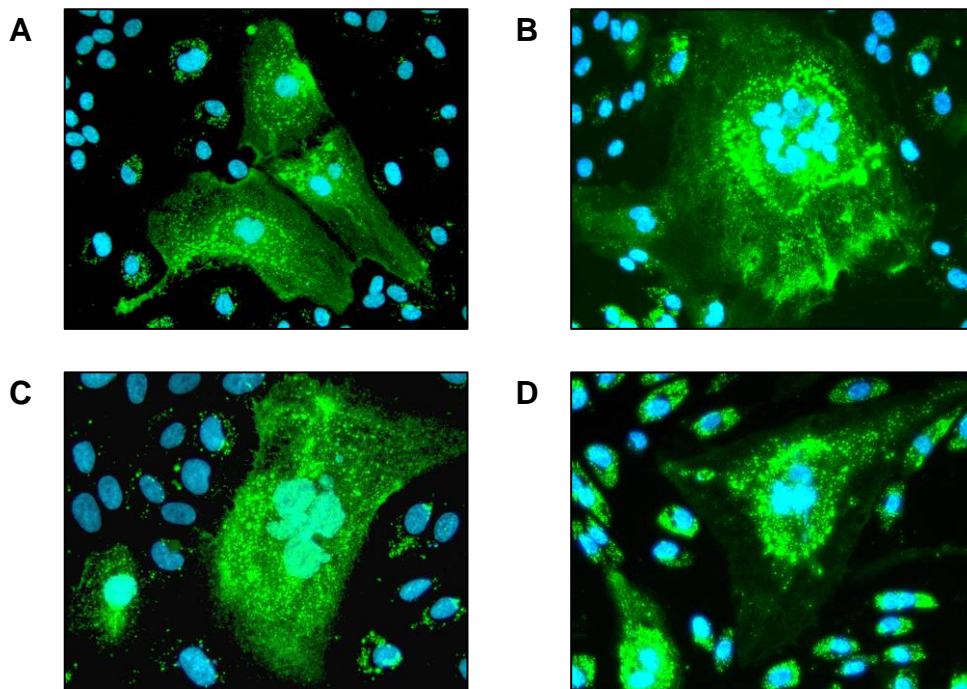


Abbildung 4.36: Synzytienbildung bei infizierten HUVEC.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Synzytienbildung bei HUVEC 24 h (C), 48 h (A) und 72 h (B, D) nach der Infektion mit Wü4797 (A, B) und Wü5679 (C, D) bei einer MOI von 0,1 (A, B) oder 0,5 (C, D) unter Verwendung des MV-N-spezifischen mAk F227 (grün). Die Zellkerne (blau) sind mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt worden. Vergrößerung 400x.

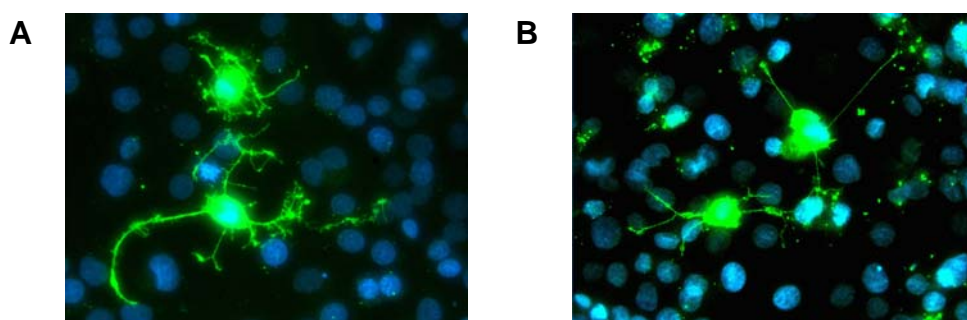


Abbildung 4.37: Ausbildung filiformer Ausläufer bei infizierten HBMEC.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Ausbildung filiformer Ausläufer bei HBMEC 48 h nach der Infektion mit WTFb (A) und Wü4797 (B) bei einer MOI von 0,1 unter Verwendung des Hyperimmunsereum eines an SSPE Erkrankten (grün). Die Zellkerne (blau) sind mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt worden. Vergrößerung 400x.

Zur Kontrolle der Synzytienbildung wurden BJAB-Zellen bei einer niedrigen MOI von 0,01 mit den virulenten Masernvirusstämmen infiziert und bis zu 3 d nachbeobachtet. Während die Infektion mit WTFb schon nach 24 h eine ausgeprägte Synzytienbildung hervorrief, waren die mit Wü4797, Wü5679 und Wü7671 infizierten Kulturen von BJAB-Zellen durch eine geringe bis mäßige, langsamer verlaufende Synzytienbildung gekennzeichnet. Auffällig war auch eine Veränderung der Morphologie dieser Zellen zu kleinen, dysmorphen, apoptotisch anmutenden Zellen zu beobachten. Abbildung 4.38 gewährt dazu eine bildliche Übersicht.

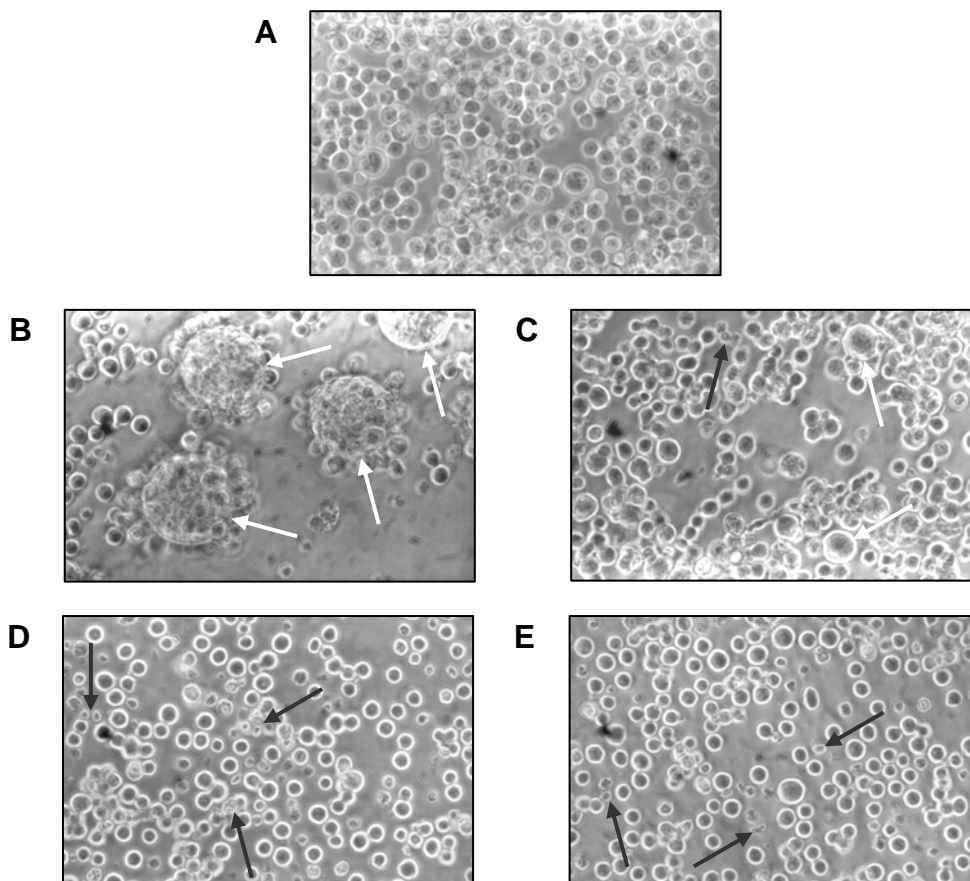


Abbildung 4.38: Zytopathische Effekte bei infizierten BJAB-Zellen.

Phasenkontrastmikroskopische Darstellung der zytopathischen Effekte in Form von Synzytienbildungen (weiße Pfeile) oder Veränderung der Zellmorphologie (graue Pfeile) bei BJAB-Zellen 24 h nach der Infektion mit WTFb (B), Wü4797 (C), Wü5679 (D) und Wü7671 (E) bei einer MOI von 0,01. Zum Vergleich sind uninfizierte BJAB-Zellen abgebildet (A). Vergrößerung 400x.

4.4.2 Durchflusszytometrische Auswertung der Masernvirusinfektion

Zur Quantifizierung des Ausmaßes, der Ausbreitung und der Intensität der Masernvirusinfektion wurden HUVEC und HBMEC durchflusszytometrisch auf die Expression des Masernvirushämagglutininproteins und damit auf die Infektion mit Masernviren analysiert. Als Kontrolle fungierte dabei die Zelllinie B95a, die permissiv für attenuierte wie auch virulente Masernvirusstämme ist.

Eine Übersicht über die durchflusszytometrische Quantifizierung der Infektion von HUVEC und HBMEC mit dem attenuierten Masernvirusstamm Edm und den virulenten Masernvirusstämmen WTFb, Wü4797 und Wü5679 gewähren Abbildungen 4.39 und 4.40, die dazugehörigen Histogrammkurven sind in Abbildung 4.41 dargestellt. HUVEC und HBMEC exprimierten das Hämagglutininprotein schon nach 24 h durch 20–30 % ihrer Zellen, nach 72 h waren nahezu alle HBMEC, nach 96 h nahezu alle HUVEC in der Kultur infiziert. Vor allem bei HBMEC war eine schnelle und damit effiziente Ausbreitung der Infektion durch Edm zu beobachten, die sich bei B95a-Zellen so nicht darstellen ließ. In die Messungen nach 72, in jedem Fall 96 h aufwärts gingen infizierte und lysierte Zellen oder große Synzytien aufgrund der durchflusszytometrischen Bedingungen nicht ein und zeigten somit eher falsch-niedrige Werte. Die Intensitätskurve der mittleren Fluoreszenzsignale als Ausdruck der Intensität der oberflächlichen Hämagglutininexpression stieg für HUVEC und HBMEC vergleichbar stetig an, um nach 96 h bei HBMEC und nach 120 h bei HUVEC beim 150fachen des Fluoreszenzsignals gegenüber der Mockkontrolle ein Plateau zu erreichen. Die Intensitätskurve für B95a-Zellen stieg ab dem dritten Tag deutlich steiler als diejenige von HUVEC und HBMEC bis auf Werte von knapp dem 400fachen Fluoreszenzsignal gegenüber der Mockkontrolle an. Auch die Histogrammkurven sollen diese Ergebnisse noch einmal verdeutlichen. Für B95a-Zellen war ein verhaltenerer Verlauf der Infektion mit Edm gegenüber Endothelzellen, dafür eine stärker nach rechts verschobene Kurve nach 120 h zu erkennen. Bei HUVEC und HBMEC war eine starke Hämagglutininexpression schon nach 48 h zu beobachten, die bei HBMEC schon nach 96 h ein ähnliches Ausmaß wie nach 120 h erreichte.

Unter den virulenten Masernvirusstämmen WTFb, Wü4797 und Wü5679 hob sich Wü4797 bei der Infektion von HUVEC deutlich ab. Während die Expression des Hämagglutininproteins über 6 d hinweg nur bei 10–20 % der gemessenen, mit WTFb und Wü5679 infizierten HUVEC und HBMEC nachweisbar war, konnte eine effiziente Ausbreitung von Wü4797 in der Kultur von HUVEC ab dem dritten Tag, so aber nicht in der von HBMEC verzeichnet werden. Die Intensitätskurven der mittleren Fluoreszenzsignale als Ausdruck der Intensität der oberflächlichen Hämagglutininexpression von WTFb und Wü5679 verhielten sich für HUVEC und HBMEC ähnlich flach und erreichten das 5–15fache des Fluoreszenzsignals der Mockkontrolle. Die Infektion von HUVEC mit Wü4797 zeigte ein mittelstarkes und deutlich ansteigendes Niveau der Hämagglutininexpression im Bereich des 40fachen des Fluoreszenzsignals der Mockkontrolle, die Intensität der Infektion von HBMEC dagegen ähnelte der der übrigen Wildtypstämme. Die FACS-Kurven veranschaulichen diese Ergebnisse. Die virulenten Masernvirusstämme infizierten allesamt sehr effizient, vollständig und in vergleichbarer Weise B95a-Zellen, Unterschiede zur Infektion mit dem attenuierten Masernvirusstamm Edm fanden sich lediglich im Fluoreszenzniveau ab dem vierten Tag nach Infektionsbeginn. Die Mehrzahl der HUVEC und HBMEC wiesen keinerlei von der Mockkontrolle abhebendes Fluoreszenzsignal auf, ein kleiner Teil der Zellen zeigte mit einem heterogen, plateauartig über die mittleren bis hohen Fluoreszenzbereiche verteilten Fluoreszenzsignal eine klare Hämagglutininexpression. Die Histogrammkurven, die für die Infektion von HUVEC mit Wü4797 stehen, offenbarten nach dem Zeitraum von 48 h einen zweigipfligen Verlauf, so dass von einer effizienten, nicht alle Zellen betreffende Infektion dieser Endothelzellart ausgegangen werden kann.

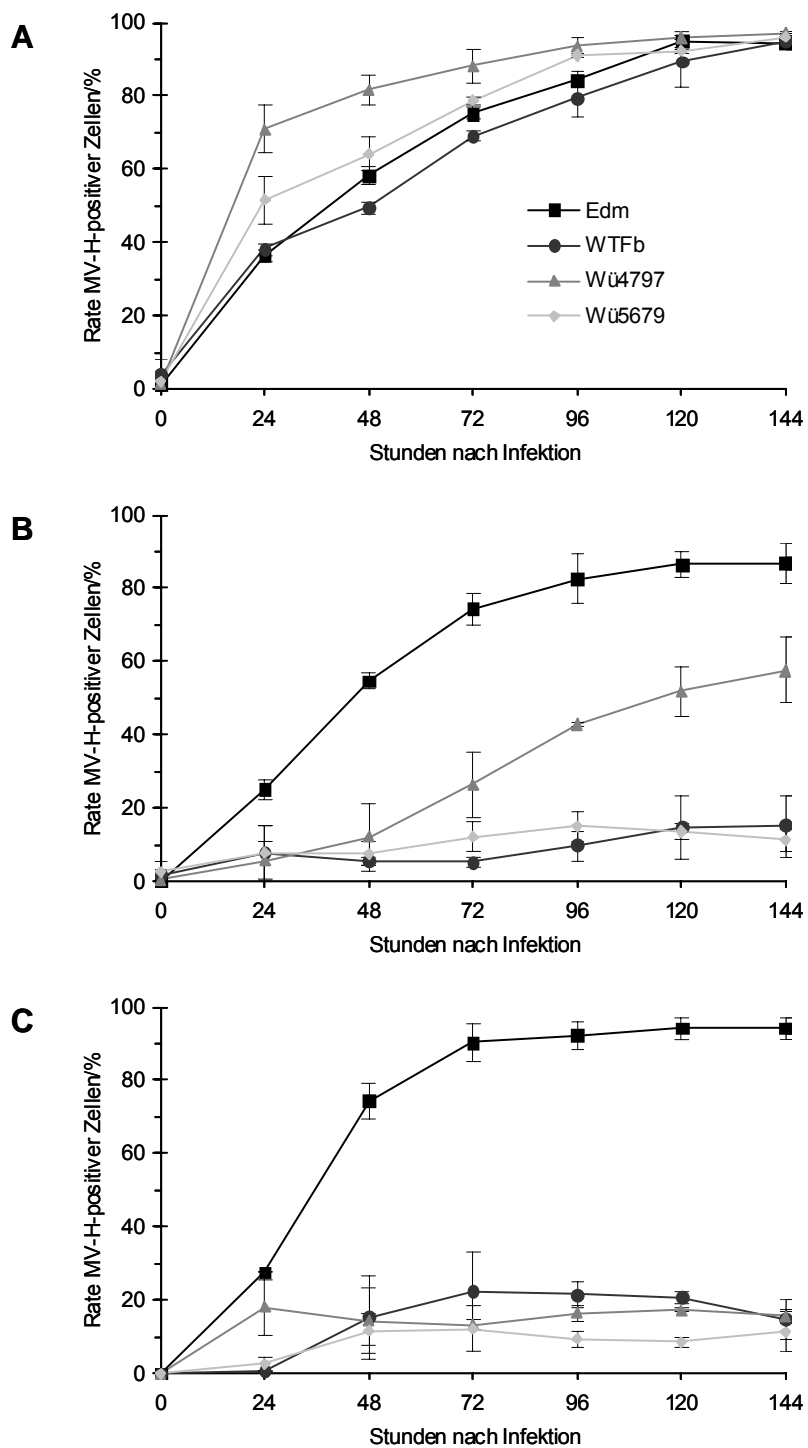


Abbildung 4.39: Infektionsausbreitung und –kinetik von Masernviren bei HUVEC und HBMEC. FACS-Analyse der Infektion von B95a-Zellen (A), HUVEC (B) und HBMEC (C) mit Edm, WTFb, Wü4797 und Wü5679 bei einer MOI von 0,5 über 6 d unter Verwendung des MV-H-spezifischen mAk K83. Dargestellt ist die Rate der fluoreszenzpositiven Zellen. Legende s. (A).

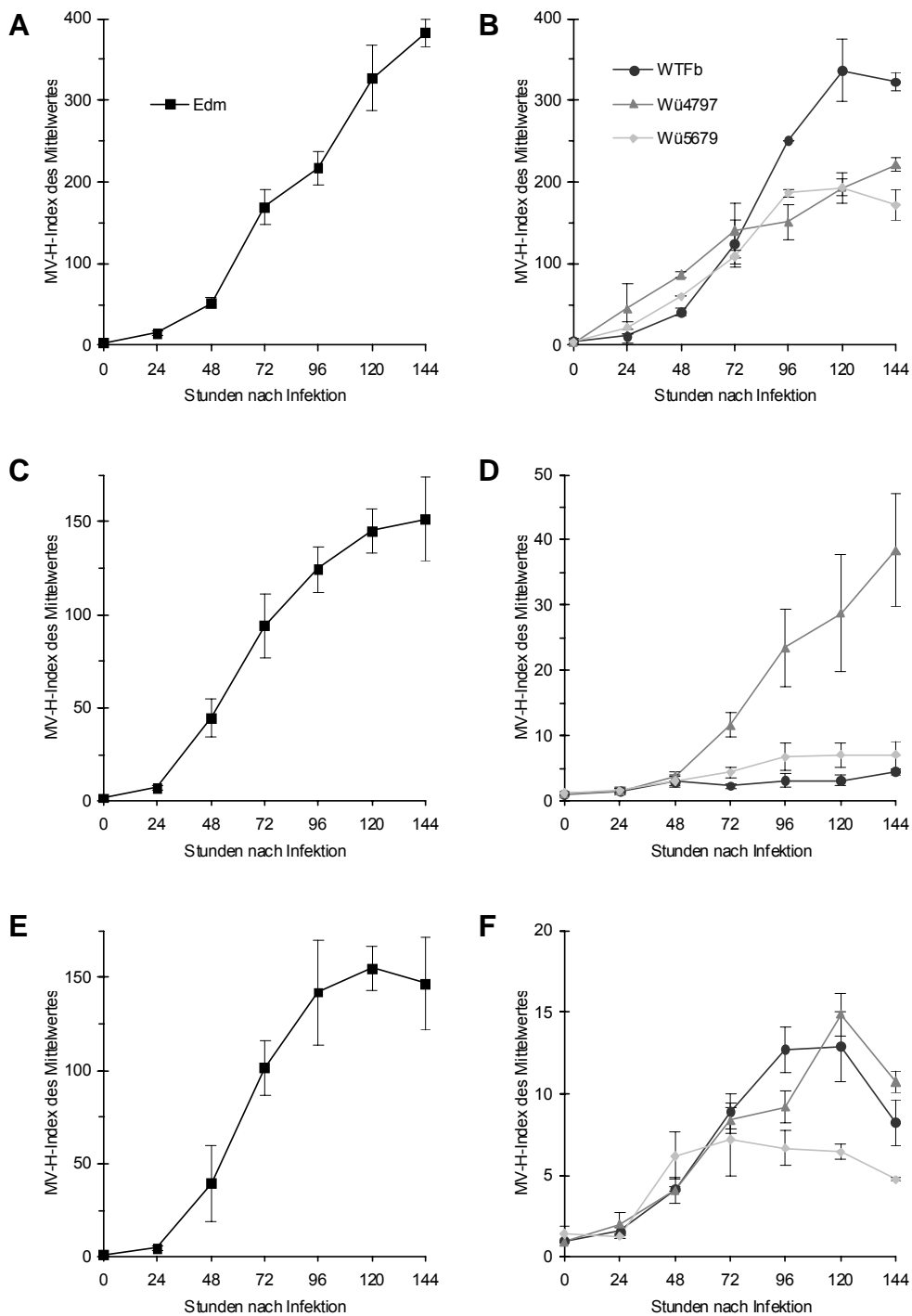


Abbildung 4.40: Infektionsintensität und –kinetik von Masernviren bei HUVEC und HBMEC.

FACS-Analyse der Infektion von B95a-Zellen (A, B), HUVEC (C, D) und HBMEC (E, F) mit Edm (A, C, E), WTFb, Wü4797 und Wü5679 (B, D, F) bei einer MOI von 0,5 über 6 d unter Verwendung des MV-H-spezifischen mAk K83. Dargestellt ist die Intensität des mittleren Fluoreszenzsignals als Index des Mittelwertes gegenüber entsprechenden Mockkontrollen. Legende s. (A, B).

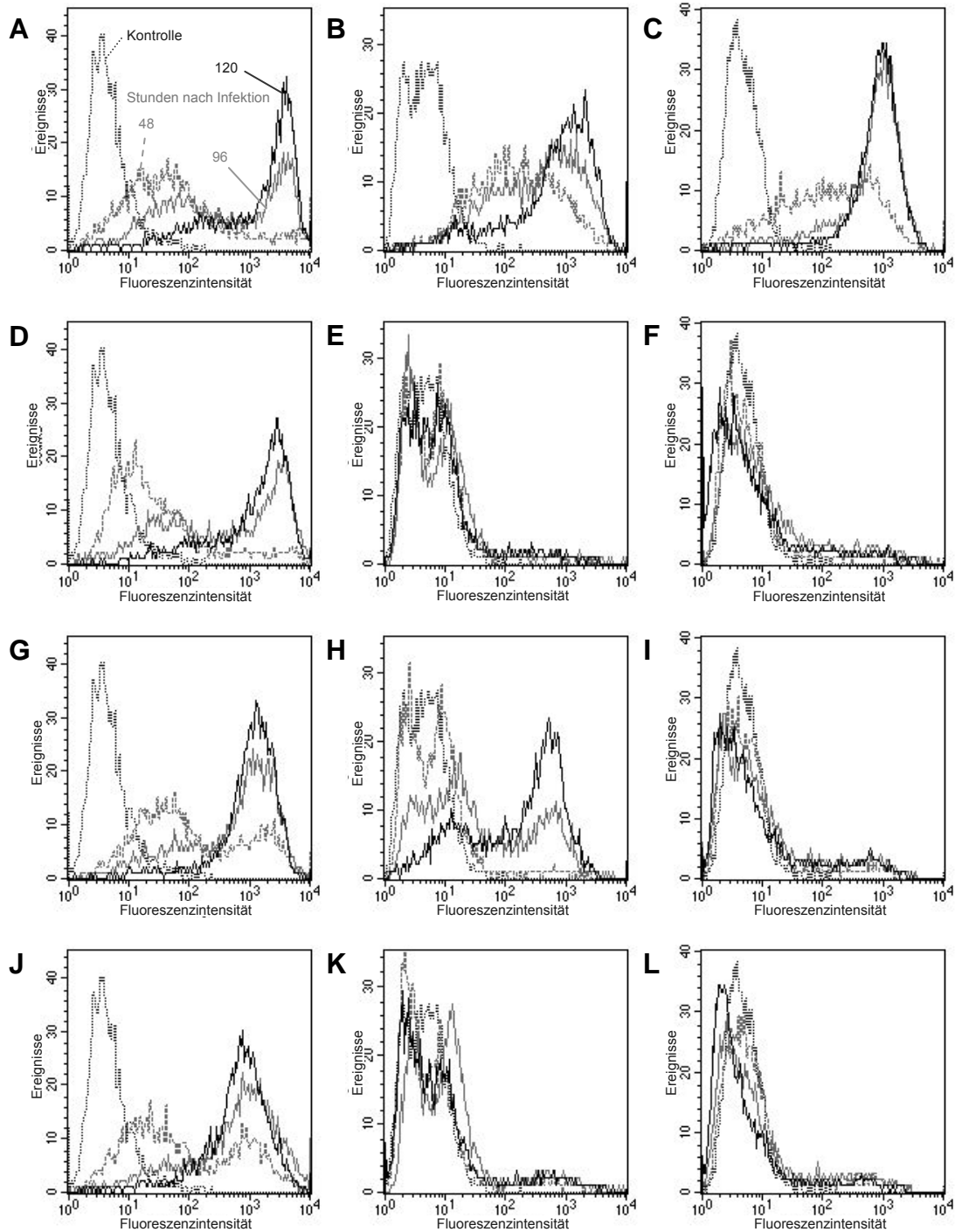


Abbildung 4.41: Analyse der Infektionsintensität von Masernviren bei HUVEC und HBMEC.

FACS-Analyse der Infektion von B95a-Zellen (A, D, G, J), HUVEC (B, E, H, K) und HBMEC (C, F, I, L) mit Edm (A–C), WTFb (D–F), Wü4797 (G–I) und Wü5679 (J–L) bei einer MOI von 0,5 über 48, 96 und 120 h unter Verwendung des MV-H-spezifischen mAk K83 gegenüber einer Mockkontrolle. Beschriftung s. (A).

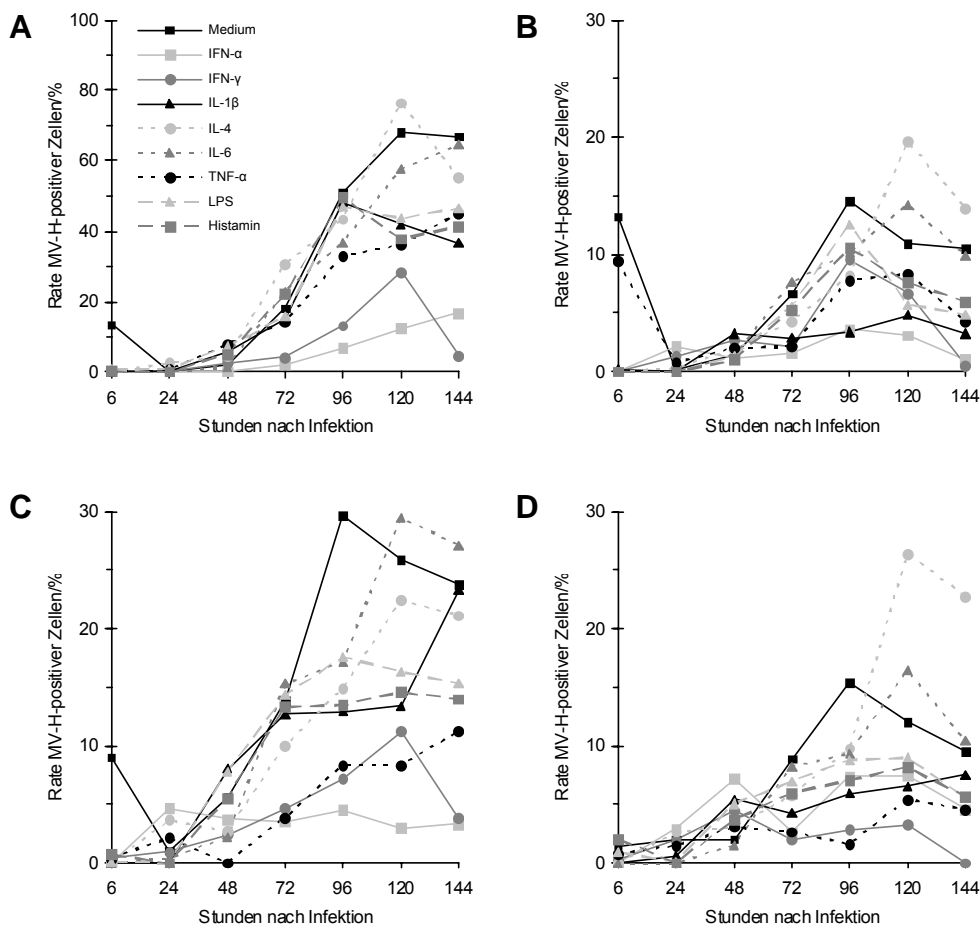


Abbildung 4.42: Stimmulationsabhängige Infektionskinetik von Masernviren bei HUVEC.

FACS-Analyse der Infektion von HUVEC mit Edm (A), WTFb (B), Wü4797 (C) und Wü5679 (D) bei einer MOI von 0,1 über 6 d in Abhängigkeit der Stimulation der Zellen mit IFN- α 1.000 U/ml, IFN- γ 100 U/ml, IL-1 β 100 U/ml, IL-4 50 U/ml, IL-6 100 U/ml, TNF- α 100 U/ml, LPS 1 μ g/ml und Histamin 10 μ M gegenüber der Mediumkontrolle unter Verwendung des MV-H-spezifischen mAk K83. Dargestellt ist die Rate der fluoreszenzpositiven Zellen. Legende s. (A).

Um einen begünstigenden oder sogar hemmenden Effekt einer Zellstimulation auf die Masernvirusinfektion zu untersuchen, wurden in einer weiteren Versuchsreihe HUVEC und HBMEC vor und nach Beginn der Infektion mit verschiedenen Zytokinen, Lipopolysacchariden von *Escherichia coli* und dem Hormon Histamin stimuliert. Übersichten hierzu gewähren Abbildungen 4.42 und 4.43. Die Ergebnisse zeigten dabei im Vergleich zu unstimulierten HUVEC und HBMEC keinen wesentlichen und signifikant

begünstigenden oder hemmenden Effekt der Stimulation mit IL-1 β , IL-4, IL-6, TNF- α , LPS oder Histamin auf die Ausbreitung der Infektion innerhalb der Kultur. Die Stimulation von HUVEC und HBMEC mit IFN- α und IFN- γ schien eine Hemmung der Ausbreitung der Infektion mit Edm, in geringerem Maße mit Wü4797, innerhalb der Kultur zu bewirken, da die Rate der infizierten Zellen im Vergleich zu den unstimulierten Zellen niedrig blieb und auch der Zuwachs an infizierten Zellen über den gesamten Messzeitraum verhalten ausfiel.

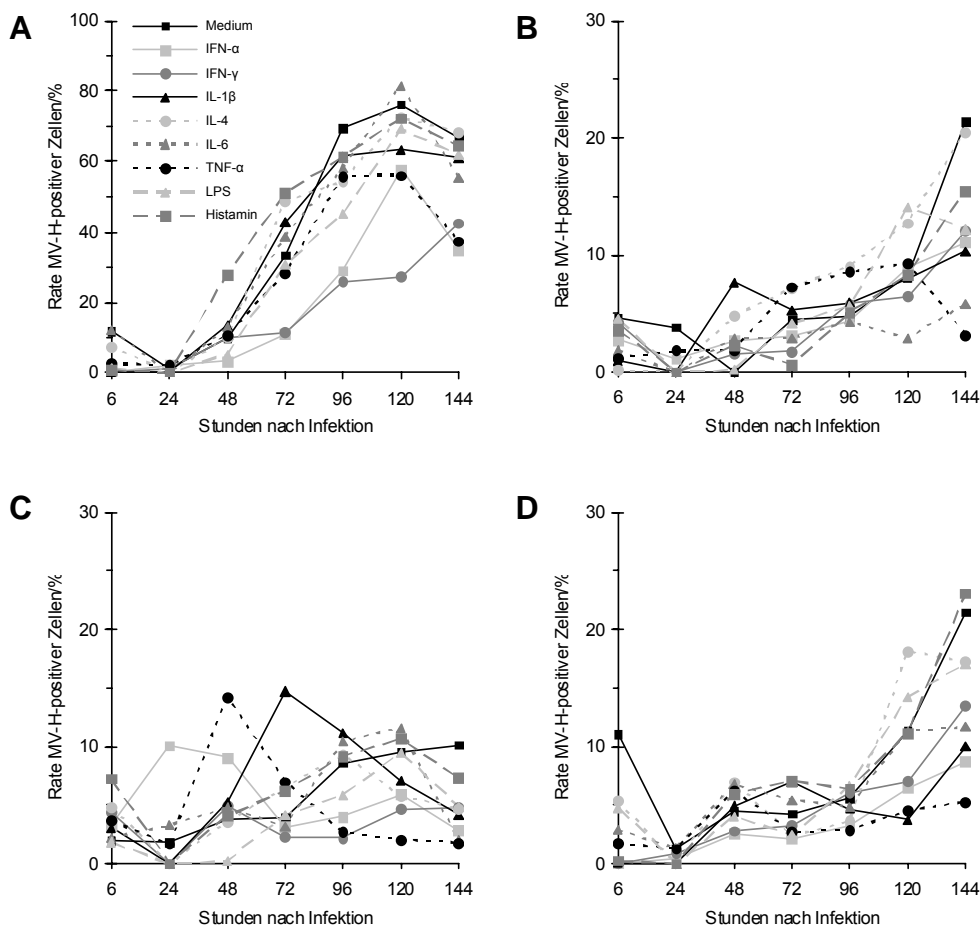


Abbildung 4.43: Stimulationsabhängige Infektionskinetik von Masernviren bei HBMEC.

FACS-Analyse der Infektion von HBMEC mit Edm (A), WTFb (B), Wü4797 (C) und Wü5679 (D) bei einer MOI von 0,1 über 6 d in Abhängigkeit der Stimulation der Zellen mit IFN- α 1.000 U/ml, IFN- γ 100 U/ml, IL-1 β 100 U/ml, IL-4 50 U/ml, IL-6 100 U/ml, TNF- α 100 U/ml, LPS 1 μ g/ml und Histamin 10 μ M gegenüber der Mediumkontrolle unter Verwendung des MV-H-spezifischen mAk K83. Dargestellt ist die Rate der fluoreszenzpositiven Zellen. Legende s. (A).

4.4.3 Replikation und Amplifikation von Masernviren

Schließlich wurde in anschließenden Versuchen die Infektion von Endothelzellen mit attenuierten und virulenten Masernvirusstämmen durch ihre Replikation und Produktion von infektiösen Masernviruspartikeln innerhalb der Kulturen von HUVEC und HBMEC mittels der Endpunkttitration analysiert. Die Ergebnisse sind als Virustiter in Abhängigkeit der Zeit nach Infektionsbeginn in Abbildung 4.44 anschaulich dargestellt. Der attenuierte Masernvirusstamm Edm konnte von Endothelzellen deutlich besser repliziert und produziert werden als von der Zelllinie B95a, ein Titer von 1:15.625 wurde erzielt. Die Replikation und Produktion der übrigen virulenten Masernvirusstämme erreichte bei B95a-Zellen mit 1:625 ähnliche Titer wie bei Edm, der Stamm Wü4797 schien stetig effizient bis zu einem Titer von 1:15.625 repliziert zu werden. Im Vergleich zu Edm erzielten die virulenten Virusstämme in HUVEC und HBMEC insgesamt niedrigere Titer, die höchsten Titer lagen zwischen 1:125 und 1:625. HBMEC setzten insgesamt weniger infektiöses Virus frei als HUVEC. Die Replikation und Produktion von funktionstüchtigen und damit infektiösen Partikeln erreichte bei allen drei verwendeten Zellarten und allen vier verwendeten Masernvirusstämmen ihren Höhepunkt nach etwa 96 h.

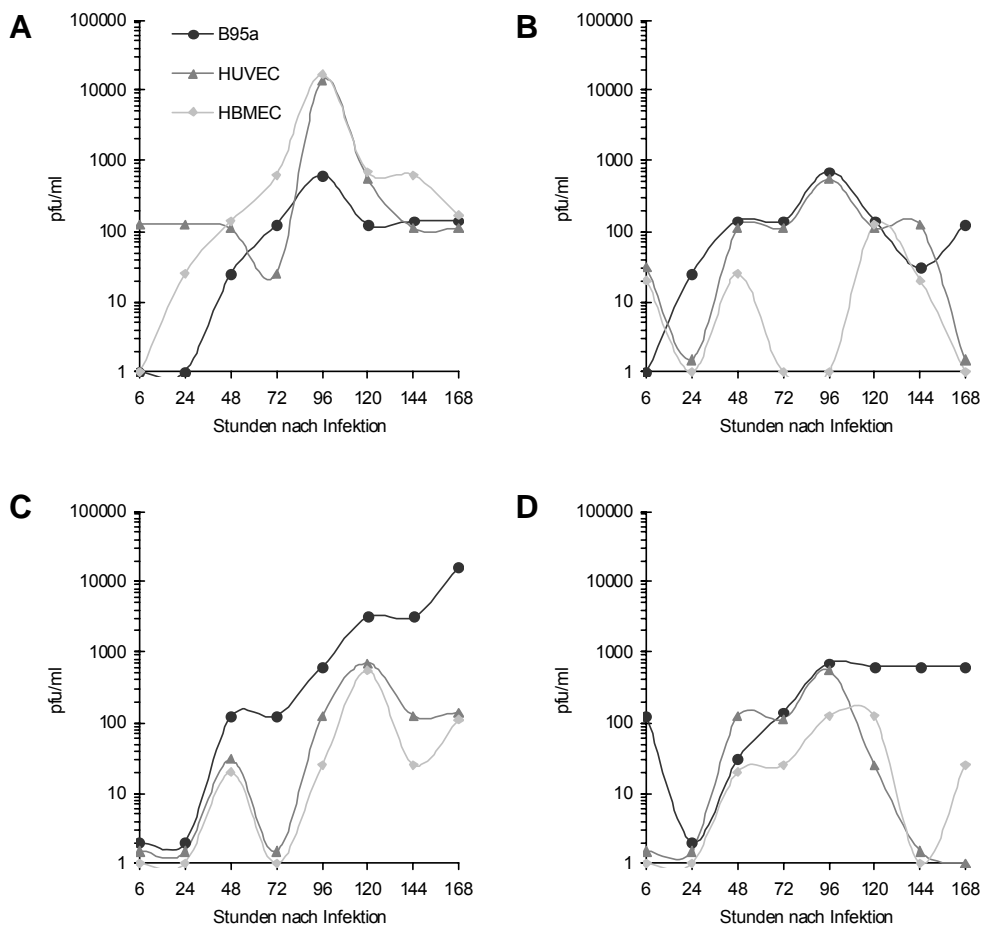


Abbildung 4.44: Replikation von Masernviren in Endothelzellkulturen.

Kinetik der Masernvirustiter nach Infektion von jeweils $1 \cdot 10^5$ B95a-Zellen, HUVEC und HBMEC mit Edm (A), WTFb (B), Wü4797 (C) und Wü5679 (D) bei einer MOI von 0,1 in 1 ml Zellkulturmedium über 7 d. Dargestellt sind die Gesamttiter von zellgebundenem und freiem Masernvirus nach deren Bestimmung durch die Endpunkttitration. Legende s. (A).

4.5 Rezeptorbenutzung und Modulation der Rezeptorexpression durch Masernviren

Unter den bekannten Masernvirusrezeptoren CD46 und SLAM kam anhand der bisherigen Ergebnisse nur CD46 als Rezeptormolekül bei HUVEC und HBMEC in Frage. Um zu beurteilen, ob virulente Masernvirusstämme in der Lage sind, CD46 als Oberflächenmolekül für ihre Bindung und rezeptorvermittelte Aufnahme in die Zielzellen zu

benutzen, wurden eine Reihe weiterer Untersuchungen angeschlossen. Die Ergebnisse sind in der Tabelle 4.2 und den Abbildungen 4.45 und 4.46 dargestellt. Neben B95a-Zellen, die nur ein im Vergleich zu der humanen Isoform verkürztes CD46-Molekül exprimieren, dem die Masernvirusbindenden Domänen fehlen, aber über eine hochgradige Expression von SLAM auf ihrer Oberfläche verfügen, wurden die Zelllinie CHO-K1 und ihre Abkömmlinge CHO-5.3 und CHO-SLAM eingesetzt, mit vier verwendeten Masernvirusstämmen infiziert und auf die Bildung von zytopathischen Effekten hin phasenkontrastmikroskopisch analysiert und ausgewertet.

Der attenuierte Masernvirusstamm Edm konnte die Zelllinien klar infizieren, die entweder CD46 oder SLAM exprimieren. Dabei schien die Infektion von SLAM-positiven Zelllinien etwas langsamer abzulaufen, da hier weniger zytopathische Effekte auftraten. Den virulenten Masernvirusstämmen WTFb, Wü4797 und Wü5679 gelang es vortrefflich, in den SLAM-positiven Zelllinien B95a oder CHO-SLAM zu replizieren, ihnen war es jedoch nicht möglich, die CD46-exprimierende Zelllinie CHO-5.3 zu infizieren. Die weder CD46 noch SLAM exprimierende Zelllinie CHO-K1 wies nach Infektion mit allen vier Masernvirusstämmen keinen zytopathischen Effekt auf.

Zellart	Masernvirusrezeptor		zytopathischer Effekt durch Masernvirusstamm			
	CD46	SLAM	Edm	WTFb	Wü4797	Wü5679
B95a	nein*	ja	++	+++	+++	+++
CHO-K1	nein	nein	–	–	–	–
CHO-5.3	ja	nein	+++	–	–	–
CHO-SLAM	nein	ja	++	+++	+++	+++

Tabelle 4.2: Übersicht über die Rezeptorbenutzung verschiedener Masernvirusstämme.

Ausmaß des mikroskopisch sichtbaren zytopathischen Effekts der Masernvirusstämme Edm, WTFb, Wü4797 und Wü5679 bei den Zelllinien B95a, CHO-K1, CHO-5.3 und CHO-SLAM etwa 48 h nach Infektion bei einer MOI von 0,1. Ausmaß des zytopathischen Effekts: (–) kein zytopathischer Effekt erkennbar, (+) bis zu 25 %, (++) 25–50 % oder (+++) mehr als 50 % beteiligte Zellen.

(*) CD46 ohne die das Masernvirus bindenden Domänen SCR1 und SCR2

Ein weiteres Indiz für eine von CD46 unabhängige Infektion von Endothelzellen wäre der Nachweis einer unverändert starken Infektion von HUVEC und HBMEC mit virulenten Masernvirusstämmen in Ab- und Anwesenheit von CD46-blockierenden, monoklonalen Antikörpern. Es wurden hierzu HUVEC und HBMEC vor ihrer Infektion mit Masernviren mit dem CD46-spezifischen, die Masernvirusbindungsstelle an der SCR1-Domäne blockierenden Antikörper B97 und mit dem CD9-spezifischen, die Masernvirusbindung nicht beeinträchtigenden Antikörper K41, beide in einer Konzentration von 10 µg/ml, inkubiert und anschließend mit Edm und Wü4797 infiziert. Nach Ablauf von 48 h wurden die Masernvirusproteine mittels eines MV-spezifischen Hyperimmunsersums eines an SSPE Erkrankten und einem entsprechenden Sekundärantikörper immunfluoreszenzmikroskopisch detektiert. Die Anwesenheit von B97 bewirkte eine fast gänzlich inhibierte Infektion von HUVEC und HBMEC mit Edm, die Infektiosität von Wü4797 wurde nicht oder kaum spürbar gehemmt.

Da eine Infektion mit dem Masernvirus eine Herabregulation der Expression des Eintrittsrezeptors mit sich führt, wurden Untersuchungen zur Rezeptormodulation durch verschiedene Masernvirusstämme sowohl bei HUVEC und HBMEC als auch bei der Zelllinie BJAB durchgeführt. Dabei wurde die Intensität der Expression von CD46 und SLAM nur bei infizierten, d. h. MV-H-exprimierenden Zellen durchflusszytometrisch 48–66 h nach Infektionsbeginn analysiert. Die Infektion mit Edm bewirkte einen Rückgang der Expression von CD46 bei BJAB-Zellen um etwa 25 %, bei HUVEC um etwa 35–40 % und bei HBMEC um 40 % gegenüber der Mockpräparation von Vero-Zellen. Dagegen zeigte die Infektion mit Edm keine Modulation der Expression von SLAM bei BJAB-Zellen. Wurden die Zellen mit WTFb, Wü4797 oder Wü5679 infiziert, war bei BJAB-Zellen wie auch bei HUVEC und HBMEC keine Verminderung, sondern eher eine Steigerung des Expressionslevels von CD46 zu verzeichnen. Einen eindeutigen, herabregulierenden Effekt hatten diese virulenten Masernvirusstämme auf das Ausmaß der Expression von SLAM bei BJAB-Zellen. Dieses wurde durch die Infektion mit WTFb um knapp mehr als 50 %, mit Wü4797 um etwa 30 % und mit Wü5679 um etwa 35 % gegenüber der Mockpräparation von BJAB-Zellen gesenkt. Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen eine Herabregulation von CD46 ausschließlich durch Edm und eine von SLAM ausschließlich durch WTFb, Wü4797 und Wü5679.

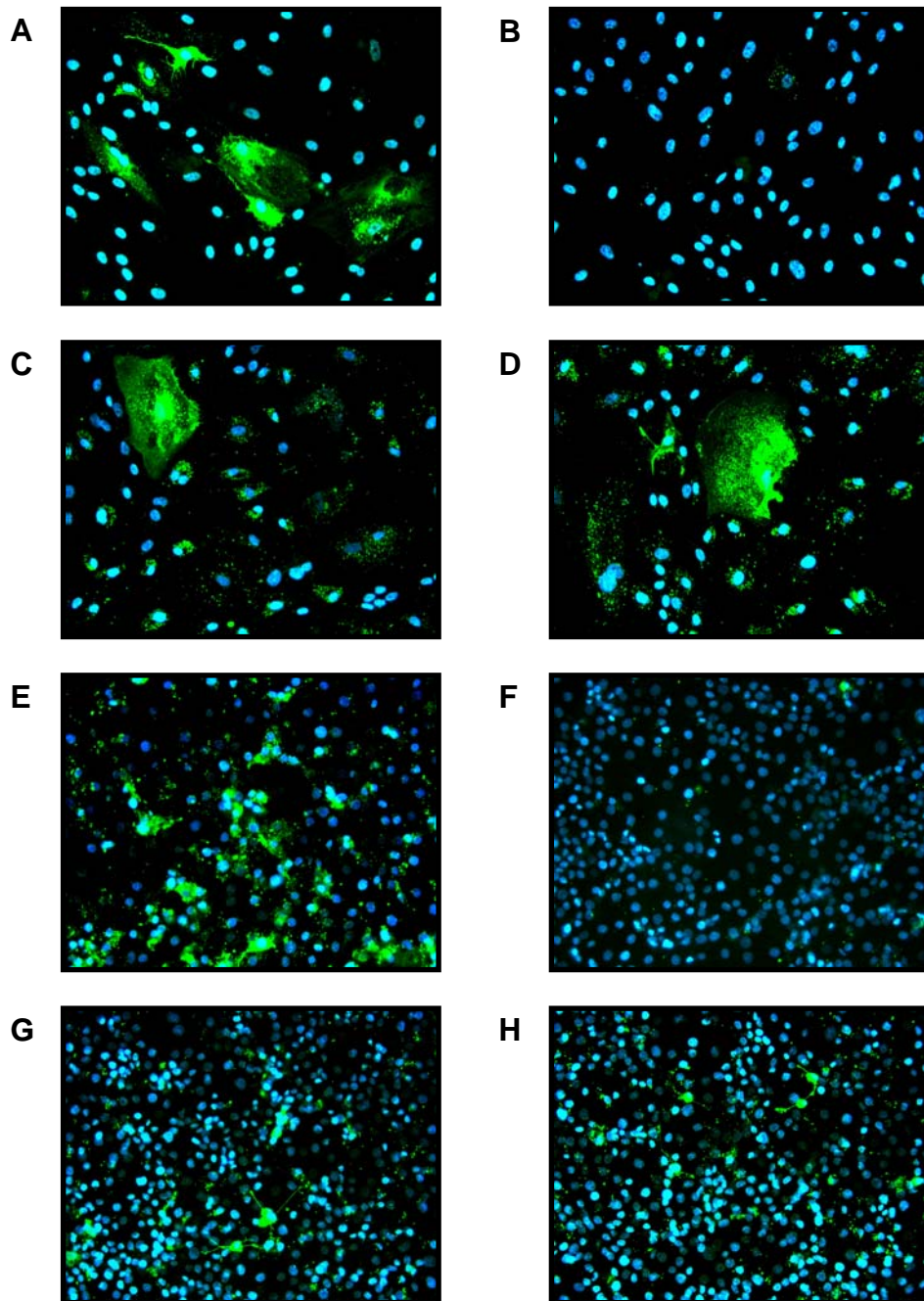


Abbildung 4.45: Infektion von Endothelzellen in Anwesenheit CD46-inhibierender Antikörper.

Fluoreszenzmikroskopische Darstellung der Infektion von HUVEC (A–D) und HBMEC (E–H) mit Edm (A, B, E, F) und Wü4797 (C, D, G, H) 48 h nach Infektionsbeginn bei einer MOI von 0,1 in Anwesenheit des CD46-bindenden mAk B97 10 µg/ml (B, D, F, H) gegenüber der Kontrolle mit dem CD9-spezifischen mAk K41 10 µg/ml (A, C, E, G). Masernvirusproteine (grün) wurden über das Hyperimmuns serum eines an SSPE Erkrankten detektiert. Die Zellkerne (blau) sind mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI gefärbt worden. Vergrößerung 160x.

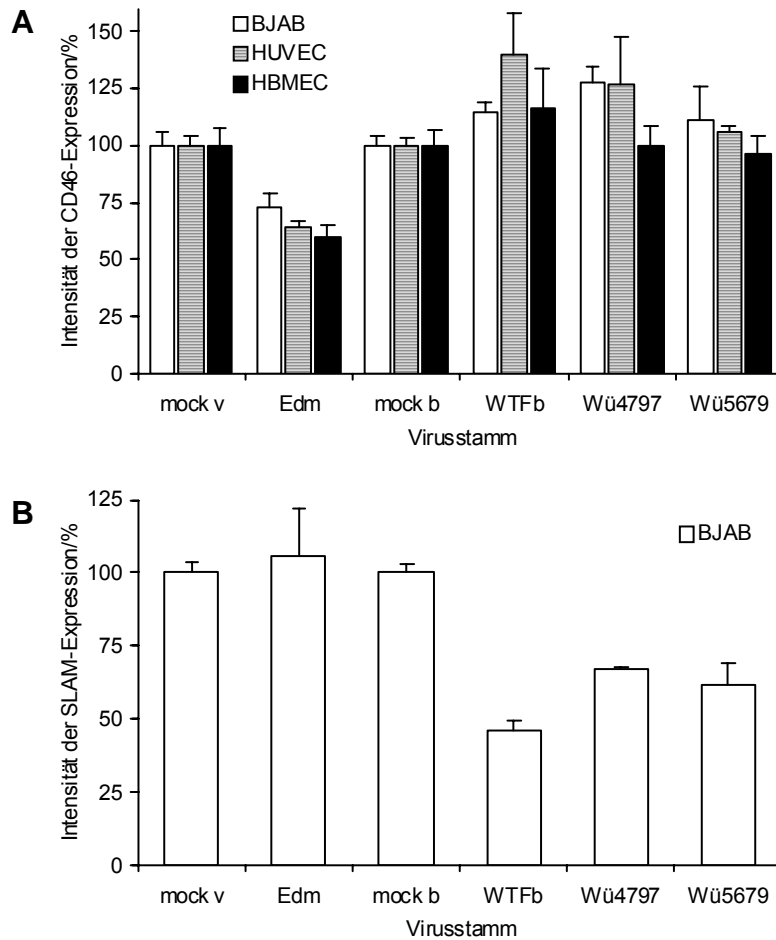


Abbildung 4.46: Rezeptormodulation durch attenuierte und virulente Masernvirusstämme.

FACS-Analyse der Rezeptorexpression und -modulation von CD46 (A) und SLAM (B) bei BJAB-Zellen (A, B), HUVEC und HBMEC (nur A) 48 h (BJAB-Zellen) oder 66 h (HUVEC und HBMEC) nach ihrer Infektion mit Edm, WTFb, Wü4797 und Wü5679 bei einer MOI von 0,5 unter Verwendung der CD46- und SLAM-spezifischen mAk 13/42 und 5C6 und des direktmarkierten MV-H-spezifischen mAk K4. Dargestellt ist die prozentuale Abweichung der Intensität des mittleren Fluoreszenzsignals gegenüber Kontrollen mit Vero- (mock v) oder BJAB-Mockpräparationen (mock b).

5 Diskussion

5.1 Bedeutung von Gefäßendothelzellen in der Pathogenese einer Masernvirusinfektion

Vaskuläre Endothelzellen sind neben Epithelzellen, Monozyten bzw. Makrophagen und Lymphozyten in der Pathogenese und Pathophysiologie einer Masernvirusinfektion als wichtige Zielzellen für das Masernvirus anzusehen (Griffin 2001). Es wird vermutet, dass das charakteristische Masernexanthem durch die Infektion dermalen Kapillarendothelzellen und damit assoziiert durch perivaskuläre, leukozytäre Infiltrate ausgelöst wird (Griffin 2001, Kimura *et al.* 1975). Epithelzellen der Epidermis, der Schweißdrüsen und der Haarfollikel scheinen dabei infiziert zu sein (Yanagihara *et al.* 1998). Einem Bericht zufolge sind im Kapillarendothel von Lymphknoten und Thymus Masernvirusantigene nachweisbar (Moench *et al.* 1988). In autopsisch gewonnenem Hirngewebe von Verstorbenen mit fatalen Verläufen einer Masernvirusinfektion sind ebenfalls infizierte Gefäßendothelzellen beschrieben worden (Esolen *et al.* 1995). Zudem ist eine Infektion kapillärer Endothelzellen bei der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis mehrfach durch neuropathologische Analysen dokumentiert (Allen *et al.* 1996, Cosby & Brankin 1995, Isaacson *et al.* 1996, Kirk *et al.* 1991). Infizierte endotheliale Zellen können auch bei infizierten Rhesusmakaken nachgewiesen werden (McChesney *et al.* 1997).

Experimentelle Forschungsarbeiten, die Wechselwirkungen zwischen Masernviren und vaskulären Endothelzellen *in vitro* untersucht und beschrieben haben, sind recht rar. Es ist bekannt, dass der attenuierte Masernvirusstamm Edmonston bovine aortale Endothelzellen infizieren kann (Csonka *et al.* 1990, Friedman *et al.* 1981). Primäre murine mikrovaskuläre Hirnendothelzellen sind mit dem Masernvirusstamm Human 2 infizierbar und neigen zu einer verhaltenen Ausbildung eines zytopathischen Effekts (Brankin

et al. 1995). Die hybride Endothelzelllinie EAhy-926 ist für den auf Vero-Zellen amplifizierten, virulenten Masernvirusstamm Halonen voll suszeptibel (Soilu-Hänninen *et al.* 1996). Experimente, die die kontaktvermittelte Virusübertragung einer infizierten Monozytenlinie auf humane Endothelzellen der Nabelschnurvene von der kontaktunabhängigen Virusübertragung über einen Membranfilter unterscheiden, ließen eine sehr gute Infizierbarkeit mit den Impfstämmen Moraten, Zagreb und CAM-70 sowie dem zellkulturadaptierten Wildtypstamm Ph26 vermuten, während die Wildtypstämme jm77, Chi1 und Pa2 eine geringere Infektiosität offenbarten (Hummel *et al.* 1998). Eine Induktion der prokoagulatorischen Aktivität von humanen Endothelzellen der Nabelschnurvene ist durch die Infektion mit einem auf Vero-Zellen propagiertem klinischem Masernvirusisolat möglich (Mazure *et al.* 1994), eine Induktion von ICAM-1 ist nach der Infektion mit den Impfstämmen Moraten und CAM-70 sowie mit dem gering passagierten Wildtypstamm Ed-wt nachgewiesen worden (Harcourt *et al.* 1999).

Eine systematische Untersuchung der Interaktion von attenuierten und virulenten Masernvirusstämmen mit primären oder immortalisierten humanen Gefäßendothelzellen *in vitro* ist bislang nicht publiziert. Die bisherig veröffentlichten Arbeiten haben zudem auch nicht zwischen CD46-benutzenden Impf- und SLAM-benutzenden Wildtypstämmen unterschieden.

5.2 Auswahl des Zellkulturmodells und Charakterisierung der verwendeten vaskulären Endothelzellen

Um die Wechselwirkung von Masernviren mit vaskulären Endothelzellen experimentell *in vitro* zu charakterisieren und die Rolle vaskulärer Endothelzellen in der Pathogenese einer Masernvirusinfektion oder ihrer Komplikationen zu verstehen, ist es bedeutsam, sich mit der Auswahl der Zellkulturmodelle der Situation *in vivo* anzunähern. Mit den *human umbilical vein endothelial cells* und den *human brain microvascular endothelial cells* kamen für die Versuchsplanung ausschließlich vaskuläre Endothelzellen humaner Herkunft zum Einsatz. Die Arbeit mit den beiden Zellarten stellt ein *in-vitro*-Modell dar

und kann zwar keinen vollständigen, aber dennoch einen annähernden Anspruch auf Authentizität *in vivo* erheben.

Human umbilical vein endothelial cells dienen in der Endothelzellforschung als etabliertes *in-vitro*-, ja sogar als *ex-vivo*-Modell für die zellbiologische Funktionalität vaskulärer Endothelzellen. Als primäre Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene sind sie nicht durch eine sekundäre Manipulation in Form einer Immortalisierung verändert worden und können dadurch eher die Verhältnisse *in vivo* repräsentieren als es transfizierte oder hybridisierte endotheliale Zelllinien vermögen. Ein unschätzbare Vorteil für infektiologische Experimente ist ihr fetaler Ursprung, ein Kontakt der Zellen mit bakteriellen oder viralen Krankheitserregern hat bisher nicht oder wenig wahrscheinlich stattgefunden. Ein gewisser, aber vernachlässigbarer Nachteil stellt ihre makrovaskuläre Eigenschaft und das eher mehrschichtige Wachstumsverhalten *in vivo* dar. Weitere Vorteile sind ihre recht einfache Gewinnung und die breite wissenschaftliche Erfahrung seit ihrer Erstbeschreibung (Jaffe *et al.* 1973).

Human brain microvascular endothelial cells, eine aus Hirnbiopsien isolierte und mit dem SV40-Large-T-Antigen transfizierte humane mikrovaskuläre Hirnendothelzelllinie, werden für infektiologische Untersuchungen zur Rolle der Blut-Hirn-Schranke bei der Neurovirulenz humanpathogener Bakterien oder Viren verwendet. Die Zelllinie exprimiert oder bindet die zerebrospezifischen Endothelzellmarker γ -Glutamyltranspeptidase, Carboanhydrase IV und Ulex-europaeus-Agglutinin I, das Expressionsniveau des von-Willebrand-Faktors nimmt jedoch mit zunehmender Passagierung ab (Stins *et al.* 2001). Mit diesen Eigenschaften qualifiziert sich die humane mikrovaskuläre Hirnendothelzelllinie in Verbindung mit den Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene für eine systematische Untersuchung der Interaktion von Masernviren mit vaskulären Endothelzellen auch im Hinblick auf eine mögliche Beteiligung auf die Neurovirulenz des Erregers.

Zur Bearbeitung der Fragestellung dieser Arbeit wurde zunächst die Isolation und Kultur von Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene HUVEC im hauseigenen Laboratorium organisiert, etabliert und optimiert. Zusätzlich wurde die humane mikrovaskuläre Hirnendothelzelllinie HBMEC in Kultur genommen. Wegen möglicher Interferenzen durch masernvirusspezifische Antikörper wurde trotz gängiger Empfehlungen

auf den Einsatz von humanem Serum als Mediumzusatz verzichtet. Beide endothelialen Vertreter wurden anschließend charakterisiert und auf ihre Endothelzelleigenschaften überprüft.

Morphologisch wiesen HUVEC wie HBMEC ein unterschiedliches, aber typisches endotheliales Wachstumsmuster auf (Abbildungen 4.1 und 4.2). Der immunfluoreszenzmikroskopische und durchflusszytometrische Nachweis der endothelzellspezifischen Moleküle von-Willebrand-Faktor, Ulex-europaeus-Agglutinin I und E-Selektin bei fast der gesamten Population der HUVEC belegt die endotheliale Eigenschaft und den hohen Reinheitsgrad der primären Zellen als essentielle Grundlage für die anschließenden Experimente (Abbildungen 4.3–4.9 und 4.11). HBMEC hingegen schienen einige endotheliale Eigenschaften mit der Immortalisierung oder zunehmender Passagierung qualitativ und quantitativ verloren zu haben (Abbildungen 4.3, 4.5–4.9 und 4.11). Unter der Annahme, dass die durchflusszytometrische Messung der immunfluoreszenzmikroskopischen Detektion in ihrer Sensitivität leicht überlegen ist, darf eine schwache Positivität von HBMEC für den von-Willebrand-Faktor postuliert werden (Abbildungen 4.3, 4.6 und 4.7). Einen eindeutigen Beweis könnte der Nachweis von vWF-spezifischer mRNA durch die Methode der RT-PCR bieten. Neben der qualitativen und quantitativen Analyse der bedeutendsten endothelzellspezifischen Markermoleküle wurde die Expression verschiedener weiterer endothelialer Oberflächenproteine bestimmt, die die leukozytäre Interaktion mit vaskulären Endothelzellen durch Adhäsion oder Signalübertragung vermitteln. Es wurde nicht nur der eindeutige Nachweis von ICAM-1 und des ubiquitär exprimierten HLA-Moleküls HLA-Klasse-I, sondern auch des HLA-Moleküls HLA-Klasse-II nach Stimulation der Zellen mit IFN- γ oder IL-1 β geführt, der die Funktion der Leukozytenadhäsion und Antigenpräsentation beider Endothelzellarten unterstreicht (Abbildungen 4.8–4.11).

5.3 Systematische Analyse der Masernvirusrezeptorexpression durch Gefäßendothelzellen

Bislang wurden die Oberflächenmoleküle CD46 und SLAM als Masernvirusrezeptoren identifiziert (Erlenhoefer *et al.* 2001, Dörig *et al.* 1993, Hsu *et al.* 2001, Naniche *et al.* 1993, Tatsuo *et al.* 2000b). Eine vollständige und systematische Analyse der Expression der beiden Masernvirusrezeptoren durch vaskuläre Endothelzellen gibt es bislang nicht. Daher wurde hier die Expression von CD46 und SLAM auf verschiedenen zellulären Ebenen bei HUVEC und HBMEC mittels RT-PCR, Western-Blot-Verfahren und Durchflusszytometrie untersucht. Die Analysen belegen eine konstitutive Expression von CD46 durch beide Zellarten, SLAM hingegen wurde bei HUVEC und HBMEC weder auf der Ebene der transkribierten mRNA noch auf der Ebene des translatierten Proteins nachgewiesen (Abbildungen 4.12, 4.13 und 4.17–4.22). Da eine Aktivierung von Monozyten mit Phytohämagglutinin, LPS oder UV-inaktivierten Masernviren bei eben diesen Zellen zu einer Induktion der Expression von SLAM führt (Minagawa *et al.* 2001) und diese Induktion über eine Aktivierung von TLR2 vermittelt zu werden scheint (Bieback *et al.* 2002), wurden weiterführende Experimente angeschlossen, um eine Induktion der Expression von SLAM bei HUVEC und HBMEC detektieren zu können. Dafür wurden beide Zellarten mit IL-1 β , TNF- α , LPS oder UV-inaktiviertem WTFb oder Wü4797 vorstimuliert und wiederum auf die Expression von SLAM überprüft. Die Ergebnisse zeigen auf, dass solch eine Induktion trotz der Expression von TLR2 durch HUVEC und HBMEC nicht möglich ist (Abbildungen 4.15, 4.16, 4.18–4.20 und 4.22). Die Vorstimulation der Endothelzellen bewirkte ebenfalls keinen wesentlichen Effekt auf das Expressionsniveau von CD46 (Abbildungen 4.14, 4.17, 4.19 und 4.22). Im Rahmen dieser Untersuchungsreihen wurde erstmals TLR2-spezifische mRNA bei HBMEC nachgewiesen (Abbildung 4.16). Da ausschließlich polyklonale TLR2-spezifische Antikörper für eine indirekte Immunfluoreszenzdetektion zur Verfügung standen, war auf eine durchflusszytometrische Bestätigung der Befunde wegen schwacher Signale und störender Interferenzen verzichtet worden.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die beiden humanen Endothelzellvertreter HUVEC und HBMEC den Masernvirusrezeptor CD46 in einem physiologisch

bedeutenden Ausmaß exprimieren. Eine Expression von SLAM, sei sie konstitutiv oder induziert, ist nicht möglich. Diese Schlussfolgerung deckt sich mit Beobachtungen bei der immunhistochemischen Untersuchung von pathologischen Präparaten auf die Expression von Masernvirusrezeptoren (McQuaid & Cosby 2002).

5.4 Wechselwirkung zwischen Masernviren und vaskulären Endothelzellen

Für eine systematische Analyse der Wechselwirkung zwischen Masernviren und vaskulären Endothelzellen wurden ausführliche Untersuchungen zur Infektion von vaskulären Endothelzellen mit Masernviren angestellt und um Experimente zur Bindung und Replikation von Masernviren an und in vaskulären Endothelzellen ergänzt. Darüberhinaus wurden Analysen zur Rezeptorbenutzung der verwendeten Masernvirusstämme und zur Rezeptormodulation angeschlossen.

Um dem Ziel natürlicher Bedingungen *in vitro* möglichst nah zu kommen, wurden neben der Wahl eines humanen Zellkultursystems, mit HUVEC sogar eines primären Zellkultursystems, virulente Masernvirusstämme eingesetzt, die zuvor nicht über Vero-Zellen, sondern ausschließlich über lymphozytäre, auch SLAM exprimierende Zellen propagiert wurden, um den Selektionsdruck einer Adaptation an CD46 zu minimieren. Es konnte hier und auch schon zuvor belegt werden, dass die verwendeten Masernvirusstämme CD46-exprimierende CHO-5.3-Zellen nicht infizieren (Abbildung 4.21, Tabelle 4.2 und Erlenhofer *et al.* 2002). Es besteht ein allgemeiner Dissens über die Rezeptorbenutzung von klinischen Masernvirusisolaten oder gering passagierten Masernviruswildtypstämmen. Einem Bericht zufolge können zwei über PBMC propagierte klinische Masernvirusisolate CD46 als zellulären Rezeptor verwenden (Manchester *et al.* 2000b). Es gibt und mehren sich aber Publikationen, die aufzeigen, dass klinische Masernvirusisolate oder virulente Masernvirusstämme mit SLAM, nicht aber mit CD46 interagieren, es sei denn, sie sind nicht an CD46-exprimierende Zellen durch hohen Selektionsdruck adaptiert (Bartz *et al.* 1996 und 1998, Buckland & Wild 1997, Erlenhofer *et al.* 2002, Hsu *et al.* 1998, Johnston *et al.* 1999, Lecoutourier *et al.* 1996, Ono *et al.* 2001b, Rima

et al. 1997, Schneider-Schaulies *et al.* 1995b, Tanaka *et al.* 1998, Xie *et al.* 1999). In bisherigen Arbeiten über die Wechselwirkung zwischen Masernviren und vaskulären Endothelzellen wurde entweder kein humanes und möglichst primäres Zellkultursystem gewählt (Brankin *et al.* 1995, Csonka *et al.* 1990, Friedman *et al.* 1981, Soilu-Hänninen *et al.* 1996), wurden nur Impfstämme oder solche Wildtypstämme verwendet, die an Vero-Zellen und damit unter hohem Selektionsdruck an CD46 adaptiert waren (Brankin *et al.* 1995, Friedman *et al.* 1981, Mazure *et al.* 1994), oder war nicht belegt, ob die eingesetzten Masernviruswildtypstämme CD46 als zellulären Rezeptor nutzen können (Harcourt *et al.* 1999, Hummel *et al.* 1998).

Es konnte hier nachgewiesen werden, dass der attenuierte Masernvirusstamm Edm sowie auch die virulenten Masernvirusstämme WTFb, Wü4797 und Wü5679 die beiden vaskulären Endothelzellvertreter HUVEC und HBMEC infizieren können (Abbildungen 4.26–4.33 und 4.39–4.41). Die nachweisliche Infektion von HUVEC und HBMEC mit den attenuierten und virulenten Masernvirusstämmen ging mit einer morphologischen Alteration und der Bildung eines zytopathischen Effekts einher, der zwar durch eine verhaltene Synzytienbildung, aber deutliche Zelllyse gekennzeichnet war (Abbildungen 4.26–4.33, 4.35 und 4.36). Auch bei BJAB-Zellen ist die Synzytienformierung stammabhängig (Abbildung 4.38). Die Beobachtung der Ausbildung filiformer Ausläufer bei infizierten HBMEC war bisher nicht beschrieben worden (Abbildung 4.37). Interessanterweise wurde gesehen, dass das Nukleokapsidprotein unter längeren Kulturbedingungen auch intranukleär angereichert wird (Abbildung 4.34). Eine mögliche Erklärung dafür könnte ein Mangel an exprimiertem Phosphoprotein oder eine Mutation in dessen Gensequenz sein (Huber *et al.* 1991).

Angesichts der hochgradigen Expression von CD46 durch Endothelzellen verwundert es nicht, dass für den Impfstamm Edm ein enormes Infektionsausmaß und eine sehr gute Ausbreitungseffizienz nachgewiesen werden konnte (Abbildungen 4.26–4.33 und 4.39–4.41). Beides konnte durch die Anwesenheit CD46-spezifischer Antikörper deutlich reduziert werden (Abbildung 4.45). Eine differentielle Betrachtungsweise ist für die Infektion der beiden Endothelzellarten mit den virulenten Masernvirusstämmen nötig. Während WTFb und Wü5679 bei einer MOI von 0,1 nur eine Subpopulation von etwa 10–20 % der HUVEC und HBMEC nachweislich infizierten, musste Wü4797 eine recht

gute Ausbreitungstendenz in der Kultur von HUVEC und deutlich weniger in derjenigen von HBMEC bescheinigt werden (Abbildungen 4.26–4.33 und 4.39–4.41). Durch die Anwesenheit CD46-spezifischer Antikörper war die Infektion mit Wü4797 nicht hemmbar (Abbildung 4.45). Eine Stimulation von HUVEC und HBMEC mit Zytokinen, LPS von *Escherichia coli* und dem Hormon Histamin vor und noch während der Infektion trug keinen eindeutigen begünstigenden oder hemmenden Effekt auf die Masernvirusinfektion mit sich, IFN- α und IFN- γ schienen allerdings das Infektionsausmaß leicht abzuschwächen (Abbildungen 4.42 und 4.43). Die durchflusszytometrisch gewonnenen Daten zur Untersuchung der Rezeptormodulation durch die verwendeten Masernviren bekräftigen die Schlußfolgerung aus dem Infektionsinhibitionsversuch, dass CD46 nur für den attenuierten Masernvirusstamm Edm, nicht aber für die virulenten Masernvirusstämme WTFb, Wü4797 und Wü5679 als zellulärer Rezeptor auf BJAB-Zellen oder vaskulären Endothelzellen fungiert (Abbildung 4.46).

Die Verteilung der Bindungskapazität von HUVEC und HBMEC für die Masernvirusstämme spiegelt in etwa die Infektiosität der Stämme in der Kultur wieder. Für Edm lag die Bindungskapazität, abhängig von der eingesetzten Virusmenge, im hohen, für Wü4797 im mittleren und für WTFb, Wü5679 und Wü7671 im niedrigen Bereich (Abbildungen 4.23–4.25). Auch wenn die Amplifikation von virulenten Masernvirusstämmen in infizierten HUVEC und HBMEC keine sehr hohen Titer erreichte, so war doch eine im Vergleich zu Edm nur unwesentlich geringgradigere Replikation und Amplifikation infektiöser Masernviruspartikel nachweisbar (Abbildung 4.44).

5.5 Pathogenetische Überlegungen und Ausblick

Die Ergebnisse dieser Arbeit belegen eine von den beiden Masernvirusrezeptoren CD46 und SLAM unabhängige Infektion humaner vaskulärer Endothelzellen mit Masernviruswildtypstämmen. Anhand dieser Beobachtungen darf ein weiterer, noch nicht bekannter zellulärer Masernvirusrezeptor postuliert werden, der den Tropismus von Masernviren für Epithel- und Endothelzellen sowie für diverse Zellen des zentralen Nervensystems

erklären könnte. Die mögliche Existenz eines noch unbekanntes zellulären Rezeptors wird durch Untersuchungen mit rekombinanten Wildtypstämmen untermauert, die auch SLAM-negative Zellen ohne Beteiligung von CD46 infizieren können (Hashimoto *et al.* 2002, Takeuchi *et al.* 2002). Auch ein von einem zellulären Rezeptor unabhängiger Aufnahme- und Ausbreitungsmechanismus wäre ähnlich wie bei neuronalen Zellen denkbar (Allen *et al.* 1996, Duprex *et al.* 1999, Lawrence *et al.* 2000, McQuaid *et al.* 1998, Meissner & Koschel 1995, Urbanska *et al.* 1997). Bestrebungen zur Aufklärung des viralen Aufnahme- und Ausbreitungsmechanismus könnten weitere Einblicke in die Pathogenese einer Masernvirusinfektion oder ihrer Komplikationen bieten.

Der sichere Nachweis der Infizierbarkeit humaner Gefäßendothelzellen mit virulenten Masernvirusstämmen auch *in vitro* ermöglicht es, die Erfahrungen mit dem Zellkulturmodell für zukünftige Untersuchungen zu nutzen. Es ist als sicher anzusehen, dass Endothelzellen in der Pathogenese neurologischer Komplikationen, sei es direkt oder indirekt, involviert sind. Die Invasion von Masernviren in das zentrale Nervensystem mit Überwindung der Blut-Hirn- oder Blut-Liquor-Schranke ist grundsätzlich über folgende Wege denkbar:

1. Infektion von Kapillarendothelzellen der Blut-Hirn-Schranke mit nachfolgender Zerstörung des Endothelzellverbandes oder mit basolateralem Knospen infektiöser Partikel
2. Transmigration und Neuroinvasion infizierter Leukozyten unter Vermittlung immunologisch aktivierter Kapillarendothelzellen
3. Infektion von Epithelzellen der Blut-Liquor-Schranke mit nachfolgender Zerstörung des Epithelzellverbandes oder mit apikalem Knospen infektiöser Partikel
4. retrograde neuronale Infektion über das periphere Nervensystem oder die *Fila olfactoria* und den *Bulbus olfactorius*
5. Ausbreitung der Infektion über die zirkumventrikulären Organe

Angesichts der mehrfach dokumentierten Berichte über eine Infektion zerebrovaskulärer Endothelzellen beim Menschen *in vivo* (Allen *et al.* 1996, Cosby & Brankin 1995, Esolen *et al.* 1995, Isaacson *et al.* 1996, Kirk *et al.* 1991) scheinen die zwei, ja sogar drei letzten Varianten weniger bedeutsam. Die qualitative und quantitative Analyse der Adhäsionsmolekülexpression sowie Zytokin- und Chemokinsekretion infizierter Endothelzellen wird möglicherweise neue pathogenetische Aspekte bei der Entstehung dermalen oder neurologischer Komplikationen erschließen können. Die Membranfilterkultur könnte den Endothelzellverband der Blut-Hirn-Schranke simulieren, apikales oder basolaterales Knospen differenzieren oder in Kokultivation mit Mono- und Lymphozyten Aufschluss über komplexe immunologisch-inflammatorische Prozesse bieten.

Zusammenfassung

Obwohl eine wirksame Schutzimpfung verfügbar ist, sind Masern noch immer weltweit verbreitet. Mit etwa 750.000 Todesfällen jährlich gehören sie zu den gefährlichsten Infektionskrankheiten im Kindesalter überhaupt. Komplikationen in Verbindung mit einer Masernvirusinfektion stellen nicht nur wegen der viral induzierten Immunsuppression keine seltenen Ereignisse dar. Besonders gefürchtet sind schwer verlaufende Infektionen bei immunsupprimierten Patienten und neurologische Komplikationen, die sich als verschiedene Formen der Enzephalitis manifestieren und mit einer hohen Defektheilungsrate und Letalität einhergehen. Viele pathogenetische Aspekte und pathophysiologische Vorgänge sind dabei noch nicht gänzlich verstanden.

Vaskuläre Endothelzellen sind neben Epithelzellen, Monozyten und Makrophagen sowie Lymphozyten als wichtige Zielzellen für das Masernvirus bei der Ausbreitung der Masernvirusinfektion und Entstehung ihrer Komplikationen anzusehen. In immunhistochemisch aufbereiteten pathologischen Schnittpräparaten wurden in infizierten und stark entzündlich veränderten Arealen immer wieder infizierte Gefäßendothelzellen gefunden. Eine systematische Untersuchung der Interaktion von Masernviren mit humanen Gefäßendothelzellen *in vitro* lag allerdings bislang nicht vor.

Das Ziel dieser Dissertation war es nun, die Interaktion von attenuierten und virulenten Masernvirusstämmen mit humanen Gefäßendothelzellen grundlegend und systematisch zu untersuchen und eine Basis für die Definition pathogenetisch bedeutsamer molekularer Mechanismen zu schaffen. Hierfür wurde mit primären Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene und einer humanen mikrovaskulären Hirnendothelzelllinie ein rein humanes Zellkulturmodell gewählt und unter Verwendung attenuierter und virulenter Masernvirusstämmen den natürlichen Bedingungen Rechnung getragen. Als

essentielle Grundlage für die Untersuchungsreihen wurden die Endothelzellen auf endothelzellspezifische Markermoleküle hin untersucht und charakterisiert.

Einzig die Oberflächenproteine CD46 und SLAM sind bislang als zelluläre Rezeptoren für das Masernvirus identifiziert worden. Es konnte hier eindeutig nachgewiesen werden, dass HUVEC und HBMEC auf verschiedenen zellulären Ebenen konstitutiv CD46, nicht aber SLAM exprimieren. Weder eine Aktivierung der Endothelzellen mit diversen Zytokinen und Stimulantien, noch der Kontakt der Endothelzellen mit inaktivierten Masernviren vermochte eine Expression von SLAM zu induzieren, obwohl eine Expression von TLR2 klar aufgezeigt werden konnte. Es konnte hier ebenfalls belegt werden, dass sowohl der attenuierte Masernvirusstamm Edm als auch die virulenten Masernvirusstämme WTFb, Wü4797 und Wü5679 Endothelzellen infizieren und eine morphologische Zellalteration mit Ausbildung eines zytopathischen Effekts hervorrufen können. Weitere Analysen zeigten für Edm und Wü4797 ein enormes Infektionsausmaß und eine sehr gute Ausbreitungseffizienz, die durch die Anwesenheit CD46-spezifischer Antikörper nur bei Edm klar reduziert werden konnte. Eine Aktivierung der Endothelzellen mit diversen Zytokinen und Stimulantien trug keinen eindeutigen begünstigenden oder hemmenden Effekt auf die Masernvirusinfektion mit sich, IFN- α und IFN- γ schienen das Infektionsausmaß abzuschwächen. Folgeversuche zur Rezeptormodulation durch Masernviren deuten darauf hin, dass CD46 nur für den attenuierten Masernvirusstamm Edm, nicht aber für die virulenten Masernvirusstämme WTFb, Wü4797 und Wü5679 als zellulärer Rezeptor fungiert.

Die Ergebnisse dieser Dissertation belegen eine von den beiden Masernvirusrezeptoren CD46 und SLAM unabhängige Infektion humaner vaskulärer Endothelzellen mit Masernviruswildtypstämmen. Diese Beobachtungen lassen einen weiteren, bislang noch nicht bekannten zellulären Rezeptor oder einen von einem zellulären Rezeptor unabhängigen Aufnahme- und Ausbreitungsmechanismus bei Gefäßendothelzellen vermuten. Es darf weiterhin als sicher angesehen werden, dass Endothelzellen in der Pathogenese von masernvirusinduzierten Komplikationen, sei es direkt oder indirekt, involviert sind.

Abkürzungen

Aa.	(<i>lat.</i>) arteriae
aqua dest.	(<i>lat.</i>) aqua destillata (<i>dt.</i>) destilliertes Wasser
Art.-Nr.	Artikelnummer
ATV	(<i>engl.</i>) advanced trypsin-versene
Aufl.	Auflage
bar	Bar
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	(<i>Bezeichnung eines Masernvirusproteins</i>)
°C	Grad Celcius
C2	(<i>engl.</i>) constant domain 2
CCP	(<i>engl.</i>) complement control protein
CD	(<i>in Verbindung mit einer Zahl und ggf. mit einem Buchstaben</i>) (<i>engl.</i>) cluster of differentiation
cDNA	(<i>engl.</i>) complementary desoxyribonucleic acid (<i>dt.</i>) komplementäre Desoxyribonukleinsäure
CDV	(<i>engl.</i>) canine distemper virus
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratcentimeter
CYT -x	(<i>engl.</i>) cytoplasmic domain (<i>ggf. unter Angabe der Domäne x</i>)
d	(<i>lat.</i>) dies (<i>dt.</i>) Tag(e)

Abkürzungen

DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrrolidiniumcarbonat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
d. h.	das heißt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	(<i>engl.</i>) dolphin morbillivirus
DNA	(<i>engl.</i>) desoxy-ribonucleic acid (<i>dt.</i>) Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
Dr. med.	(<i>lat.</i>) doctor medicinae (<i>dt.</i>) Doktor der Medizin
Dr. med. vet.	(<i>lat.</i>) doctor medicinae veterinariae (<i>dt.</i>) Doktor der Tierheilkunde
Dr. rer. nat.	(<i>lat.</i>) doctor rerum naturalium (<i>dt.</i>) Doktor der Naturwissenschaften
dT	Desoxythymidin
dt.	deutsch
E _x	Extinktion bei einer Wellenlänge von <i>x</i> nm
EBV	Epstein-Barr-Virus
ECGS	(<i>engl.</i>) endothelial cell growth supplement
ECL	(<i>engl.</i>) enhanced chemoluminescence
Edm	(<i>engl.</i>) Edmonston
EDTA	(<i>engl.</i>) ethylenediaminetetraacetic acid (<i>dt.</i>) Ethylendiamintetraessigsäure
em.	(<i>lat.</i>) emeritus
engl.	englisch
E-Selektin	endotheliales Selektin
et al.	(<i>lat.</i>) et alii (<i>oder</i>) et aliae (<i>dt.</i>) und andere (<i>oder</i>) und weitere
F	(<i>bei Antikörpern</i>) Fragment

Abkürzungen

F _x	(<i>bei Masernvirusproteinen</i>) Fusionsprotein (<i>ggf. unter Angabe der Untereinheit x</i>)
FACS	(<i>engl.</i>) fluorescence-activated cell scan (<i>dt.</i>) fluoreszenzaktivierte Zytometrie (<i>oder</i>) Durchflusszytometrie
FCS	(<i>engl.</i>) fetal calf serum (<i>dt.</i>) fetales Kälberserum
FITC	(<i>engl.</i>) fluorescent isothiocyanate
frz.	französisch
fw	(<i>engl.</i>) forward
G	Gauge
g	(<i>bei Zentrifugationsschritten</i>) Gravitation
g	(<i>bei Mengenangaben</i>) Gramm
ggf.	gegebenenfalls
griech.	griechisch
h	(<i>lat.</i>) hora(-ae) (<i>dt.</i>) Stunde(n)
H	(<i>bei Masernvirusproteinen</i>) Hämagglutinin
H	(<i>bei Antikörpern</i>) (<i>engl.</i>) heavy chain
HBMEC	(<i>engl.</i>) human brain microvascular endothelial cells (<i>dt.</i>) humane mikrovaskuläre Hirnendothelzellen
HBSS	(<i>engl.</i>) Hanks' balanced salt solution
HBSS ⁽⁻⁾	HBSS ohne Calcium- und Magnesiumionen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hg.	Herausgeber
HLA	(<i>engl.</i>) human leukocyte antigen
HLA _x	HLA-Klasse-x
HRPO	(<i>engl.</i>) horseradish peroxidase (<i>dt.</i>) Meerrettichperoxidase
HUVEC	(<i>engl.</i>) human umbilical vein endothelial cells (<i>dt.</i>) Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene
ICAM-1	(<i>engl.</i>) intercellular adhesion molecule 1

Abkürzungen

IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin(e)
IgA	Immunglobulin A
IgG x	Immunglobulin G (<i>ggf. unter Angabe der Subklasse x</i>)
IgM	Immunglobulin M
IL-1 β	Interleukin-1 β
ITSM	(<i>engl.</i>) immunoreceptor tyrosine-based switch motif
IU	(<i>engl.</i>) international unit(s) (<i>dt.</i>) internationale Einheit(en)
J	Joule
kb	Kilobasenpaare
kda	Kilodalton
l	Liter
L	(<i>bei Antikörpern</i>) (<i>engl.</i>) light chain
lat.	lateinisch
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP	(<i>engl.</i>) membrane cofactor protein
MD	(<i>engl.-lat.</i>) Medicinae Doctor (<i>dt.</i>) Doktor der Medizin
MEM	(<i>engl.</i>) minimum essential medium
mg	Milligramm
μ g	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
μ l	Mikroliter
mm	Millimeter
μ m	Mikrometer
mM	Millimolar

Abkürzungen

mock	(<i>Scheinviruspräparation ohne Virus</i>)
mock b	(<i>Scheinviruspräparation ohne Virus mit BJAB-Zellen</i>)
mock v	(<i>Scheinviruspräparation ohne Virus mit Vero-Zellen</i>)
MOI	(<i>engl.</i>) multiplicity of infection
mRNA	(<i>engl.</i>) messenger ribonucleic acid (<i>dt.</i>) kodierende Ribonukleinsäure
MV	Masernvirus
N	Nukleokapsid
n. b.	nicht bekannt
n. Chr.	nach Christus
nm	Nanometer
NP-40	(<i>Bezeichnung eines Detergens</i>)
Nr.	Nummer
P-Protein	(<i>bei Masernvirusproteinen</i>) Phosphoprotein
PBMC	(<i>engl.</i>) peripheral blood mononuclear cells
PBS	(<i>engl.</i>) phosphate-buffered saline
PBS-T	(<i>engl.</i>) phosphate-buffered saline TWEEN [®]
PBS ⁽⁻⁾	PBS ohne Calcium- und Magnesiumionen
PCR	(<i>engl.</i>) polymerase chain reaction (<i>dt.</i>) Polymerase-Kettenreaktion
PDV	(<i>engl.</i>) phocine distemper virus
pfu	(<i>engl.</i>) plaque forming unit (<i>dt.</i>) plaque-bildende Einheit
pH	(<i>lat.-griech.</i>) pondus Hydrogenii
PhD	(<i>engl.-lat.</i>) Philosophiae Doctor (<i>dt.</i>) Doktor der Philosophie
PMV	(<i>engl.</i>) porpoise morbillivirus
PPRV	(<i>frz./engl.</i>) peste-des-petits-ruminants virus
Prof.	Professor
%	Prozent
rev	(<i>engl.</i>) reverse

Abkürzungen

RNA	(<i>engl.</i>) ribonucleic acid (<i>dt.</i>) Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RPE	R-Phycoerythrin
rpm	(<i>engl.</i>) rounds per minute (<i>dt.</i>) Umdrehungen pro Minute
RPMI	(<i>Bezeichnung eines Kulturmediums</i>) Roswell Park Memorial Institute
RPV	(<i>engl.</i>) rinderpest virus
rRNA	(<i>engl.</i>) ribosomal ribonucleic acid (<i>dt.</i>) ribosomale Ribonukleinsäure
RT	(<i>engl.</i>) reverse transcription (<i>dt.</i>) reverse Transkription
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S	Sedimentationskoeffizient nach Svedberg
SCR _x	(<i>engl.</i>) short consensus repeat (<i>ggf. unter Angabe der Domäne x</i>)
SDS	(<i>engl.</i>) sodium dodecyl sulfate (<i>dt.</i>) Natriumdodecylsulfat
SLAM	(<i>engl.</i>) signaling lymphocytic activation molecule
SSPE	subakute sklerosierende Panenzephalitis
STP	(<i>engl.</i>) serin-threonin-prolin-rich domain
SV40	(<i>engl.</i>) Simian (vacuolating) virus 40
TAE	(<i>engl.</i>) Tris-Acetate-EDTA
TBS	(<i>engl.</i>) tris-buffered saline
TBS-T	(<i>engl.</i>) tris-buffered saline TWEEN [®]
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin
TLR2	(<i>engl.</i>) toll-like receptor 2 (<i>dt.</i>) Toll-ähnlicher Rezeptor 2
™	(<i>engl.</i>) trade mark
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
U	(<i>engl.</i>) unit(s)

Abkürzungen

	(<i>dt.</i>) Einheit(en)
UEA-1	Ulex-europaeus-Agglutinin I
UNICEF	(<i>engl.</i>) United Nations International Children's Emergency Fund (<i>oder</i>) United Nations Children's Fund
UV	Ultraviolettlicht
V	(<i>engl.</i>) variable domain
V	(<i>als Einheit einer Zahl</i>) Volt
V	(<i>Bezeichnung eines Masernvirusproteins</i>)
V.	(<i>lat.</i>) vena
v. a.	vor allem
(v/v)	(<i>engl.</i>) volume per volume (<i>dt.</i>) Volumen pro Volumen
vWF	von-Willebrand-Faktor
WHO	(<i>engl.</i>) World Health Organization (<i>dt.</i>) Weltgesundheitsorganisation
Wü	Würzburg
(w/v)	(<i>engl.</i>) weight per volume (<i>dt.</i>) Gewicht pro Volumen
x	(<i>in Verbindung mit einer Zahl</i>) –fach
z. B.	zum Beispiel

Die Bezeichnungen von Zelllinien, Masernvirusstämmen oder Antikörperklonen sind in Kapitel 2 detailliert aufgeführt oder aus dem Textzusammenhang ersichtlich. Sowohl die Kurzbezeichnungen der chemischen Elemente als auch die Schreibweise chemischer Summenformeln nach Hill dürfen als bekannt vorausgesetzt werden. Firmennamen und Produktbezeichnungen sowie Artikelnummern sind ständigen Änderungen unterworfen und erheben daher keinen Anspruch auf aktuelle Gültigkeit. Die Angaben im Literaturverzeichnis sind an den Standard der Datenbank Pubmed angelehnt.

Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

1.1.	Schematische Darstellung des Masernviruspartikels	8
1.2.	Schematische Darstellung der vier humanen Hauptisoformen von CD46	9
1.3.	Schematische Darstellung der membrangebundenen Form von SLAM	12
3.1.	Schematischer Querschnitt durch die menschliche Nabelschnur	43
4.1.	Mikroskopische Darstellung von HUVEC 24 h nach ihrer Isolation	68
4.2.	Morphologie und Wachstumsverhalten von HUVEC und HBMEC	69
4.3.	Fluoreszenzmikroskopische Darstellung des vWF bei HUVEC und HBMEC	71
4.4.	Speicherung des vWF in den Weibel-Palade-Körperchen von HUVEC	71
4.5.	Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von UEA-1 bei HUVEC und HBMEC	72
4.6.	Zytometrische Darstellung des vWF und UEA-1 bei HUVEC und HBMEC	73
4.7.	Übersicht über die Expression des vWF bei HUVEC und HBMEC	74
4.8.	Expressionskinetik von CD54, CD62E und HLA-Klasse-II	75
4.9.	Zytometrische Darstellung von CD54 und CD62E	76
4.10.	Zytometrische Darstellung von HLA-Klasse-I und -II	77
4.11.	Übersicht über die Expression von Adhäsions- und HLA-Molekülen	79
4.12.	Gesamt-RNA von BJAB-Zellen, HUVEC und HBMEC	80
4.13.	Nachweis von CD46- und SLAM-spezifischer mRNA	81
4.14.	Nachweis von CD46-spezifischer mRNA bei stimulierten HUVEC und HBMEC	82

4.15. Analyse von SLAM-spezifischer mRNA bei stimulierten HUVEC und HBMEC	83
4.16. Nachweis von TLR2-spezifischer mRNA bei HUVEC und HBMEC	84
4.17. Expression von CD46 durch HUVEC und HBMEC	85
4.18. Expression von SLAM durch B95a-Zellen, HUVEC und HBMEC	86
4.19. Expressionskinetik von CD46 und SLAM bei HUVEC und HBMEC	87
4.20. Expression von SLAM, CD48 und CD58 durch HUVEC und HBMEC	88
4.21. Übersicht über CD46- und SLAM-exprimierende Zellen	89
4.22. Expression von CD46 und SLAM durch BJAB-Zellen, HUVEC und HBMEC	90
4.23. Übersicht über die Masernvirusbindung an native und stimulierte HUVEC	93
4.24. Analyse der Masernvirusbindung an HUVEC und HBMEC	94
4.25. Übersicht über die Masernvirusbindung an HUVEC und HBMEC	95
4.26. Morphologie von infizierten HUVEC bei einer MOI von 0,1	99
4.27. Ausbreitung einer Masernvirusinfektion bei HUVEC und einer MOI von 0,1	100
4.28. Morphologie von infizierten HBMEC bei einer MOI von 0,1	101
4.29. Ausbreitung einer Masernvirusinfektion bei HBMEC und einer MOI von 0,1	102
4.30. Morphologie von infizierten HUVEC bei einer MOI von 0,5	103
4.31. Ausbreitung einer Masernvirusinfektion bei HUVEC und einer MOI von 0,5	104
4.32. Morphologie von infizierten HBMEC bei einer MOI von 0,5	105
4.33. Ausbreitung einer Masernvirusinfektion bei HBMEC und einer MOI von 0,5	106
4.34. Intranukleäre Anreicherung des Nukleokapsidproteins bei infizierten HUVEC	107
4.35. Synzytienbildung bei infizierten HUVEC und HBMEC	107
4.36. Synzytienbildung bei infizierten HUVEC	108
4.37. Ausbildung filiformer Ausläufer bei infizierten HBMEC	108

4.38.	Zytopathische Effekte bei infizierten BJAB-Zellen	109
4.39.	Infektionsausbreitung und –kinetik von Masernviren bei HUVEC und HBMEC	112
4.40.	Infektionsintensität und –kinetik von Masernviren bei HUVEC und HBMEC	113
4.41.	Analyse der Infektionsintensität von Masernviren bei HUVEC und HBMEC	114
4.42.	Stimulationsabhängige Infektionskinetik von Masernviren bei HUVEC	115
4.43.	Stimulationsabhängige Infektionskinetik von Masernviren bei HBMEC	116
4.44.	Replikation von Masernviren in Endothelzellkulturen	118
4.45.	Infektion von Endothelzellen in Anwesenheit CD46-inhibierender Antikörper	121
4.46.	Rezeptormodulation durch attenuierte und virulente Masernvirusstämme	122

Tabellen

2.1	Übersicht über die verwendeten Zellarten und deren Herkunftsspezies	19
2.2	Übersicht über die verwendeten Masernvirusstämme	20
2.3	Übersicht über die verwendeten monoklonalen Primärantikörper	22
2.4	Übersicht über die verwendeten konjugierten, polyklonalen Sekundärantikörper	23
2.5	Übersicht über die verwendeten Oligonukleotide	26
4.1.	Vergleich der Zelldichte von HUVEC und HBMEC	69
4.2.	Übersicht über die Rezeptorbenutzung verschiedener Masernvirusstämme	119

Literatur

Allen IV, McQuaid S, McMahon J, Kirk J, McConnell R. 1996.

The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination. *J Neuropathol Exp Neurol.* 1996; 55 (4): 471–480.

Anderson JF, Goldberger J. 1911.

An experimental demonstration of the presence of the virus of measles in the mixed buccal and nasal secretions. *JAMA.* 1911; 57: 476–578.

Bartz R, Brinckmann U, Dunster LM, Rima B, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. 1996.

Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *Virology.* 1996; 224 (1): 334–337.

Bartz R, Firsching R, Rima B, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. 1998.

Differential receptor usage by measles virus strains. *J Gen Virol.* 1998; 79 (5): 1015–1025.

Bellini WJ, Rota JS, Lowe LE, Katz RS, Dyken PR, Zaki SR, Shieh WJ, Rota PA. 2005.

Subacute sclerosing panencephalitis: more cases of this fatal disease are prevented by measles immunization than was previously recognized. *J Infect Dis.* 2005; 192 (10): 1686–1693.

Bieback K, Lien E, Klagge IM, Avota E, Schneider-Schaulies J, Duprex WP, Wagner H,

Kirschning CJ, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. 2002.

Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. *J Virol.* 2002; 76 (17): 8729–8736.

Brankin B, Hart MN, Cosby SL, Fabry Z, Allen IV. 1995.

Adhesion molecule expression and lymphocyte adhesion to cerebral endothelium: effects of measles virus and herpes simplex 1 virus. *J Neuroimmunol.* 1995; 56 (1): 1–8.

Buchholz CJ, Koller D, Devaux P, Mumenthaler C, Schneider-Schaulies J, Braun W, Gerlier D, Cattaneo R. 1997.

Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46. *J Biol Chem.* 1997; 272 (35): 22072–22079.

Buckland R, Wild TF. 1997.

Is CD46 the cellular receptor for measles virus? *Virus Res.* 1997; 48 (1): 1–9.

Campbell C, Levin S, Humphreys P, Walop W, Brannan R. 2005.

Subacute sclerosing panencephalitis: results of the Canadian Paediatric Surveillance Program and review of the literature. *BMC Pediatr.* 2005; 5: 47.

Casasnovas JM, Larvie M, Stehle T. 1999.

Crystal structure of two CD46 domains reveals an extended measles virus-binding surface. *EMBO J.* 18 (11): 2911–2922.

Cocks BG, Chang CC, Carballido JM, Yssel H, de Vries JE, Aversa G. 1995.

A novel receptor involved in T-cell activation. *Nature.* 1995; 376 (6537): 260–263.

Cole JL, Housley GA Jr, Dykman TR, MacDermott RP, Atkinson JP. 1985.

Identification of an additional class of C3-binding membrane proteins of human peripheral blood leukocytes and cell lines. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1985; 82 (3): 859–863.

Cosby SL, Brankin B. 1995.

Measles virus infection of cerebral endothelial cells and effect on their adhesive properties. *Vet Microbiol.* 1995; 44 (2–4): 135–139.

Csonka E, Bayer PI, Buki K, Varady G. 1990.

Influence of the measles virus on the proliferation and protein synthesis of aortic endothelial and smooth muscle cells. *Acta Microbiol Hung.* 1990; 37 (2): 193–200.

Dhiman N, Jacobson RM, Poland GA. 2004.

Measles virus receptors: SLAM and CD46. *Rev Med Virol.* 2004; 14 (4): 217–229.

Dörig RE, Marcil A, Chopra A, Richardson CD. 1993.

The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 1993; 75 (2): 295–305.

Drenckhahn D. 2003a.

Zellenlehre. in: Benninghoff/Drenckhahn: Anatomie. Band 1. 16. Aufl. Hg. Drenckhahn D. München/Jena: Urban & Fischer, 2003. 9–91.

Drenckhahn D. 2003b.

Epithelgewebe. in: Benninghoff/Drenckhahn: Anatomie. Band 1. 16. Aufl. Hg. Drenckhahn D. München/Jena: Urban & Fischer, 2003. 94–101.

Duprex WP, McQuaid S, Hangartner L, Billeter MA, Rima BK. 1999.

Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus. *J Virol.* 1999; 73 (11): 9568–9575.

Enders JF, Peebles TC. 1954.

Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med.* 1954; 86 (2): 277–286.

Erlenhofer C, Wurzer WJ, 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.* 2001; 75 (10): 4499–4505.

Erlenhofer C, Duprex WP, Rima BK, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. 2002.

Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol.* 2002; 83 (6): 1431–1436.

Esolen LM, Takahashi K, Johnson RT, Vaisberg A, Moench TR, Wesselingh SL, Griffin DE. 1995.

Brain endothelial cell infection in children with acute fatal measles. *J Clin Invest.* 1995; 96 (5): 2478–2481.

Frankfurter Allgemeine Zeitung. 11.05.2006.

Masern breiten sich in Nordrhein-Westfalen aus. *Frankfurter Allgemeine Zeitung.* 11.05.2006: 2.

Friedman HM, Macarak EJ, MacGregor RR, Wolfe J, Kefalides NA. 1981.

Virus infection of endothelial cells. *J Infect Dis.* 1981; 143 (2): 266–273.

Gaggar A, Shayakhmetov DM, Lieber A. 2003.

CD46 is a cellular receptor for group B adenoviruses. *Nat Med.* 2003; 9 (11): 1408–1412.

Gerlier D, Loveland B, Varior-Krishnan G, Thorley B, McKenzie IF, Roubourdin-Combe C. 1994.

Measles virus receptor properties are shared by several CD46 isoforms differing in extracellular regions and cytoplasmic tails. *J Gen Virol.* 1994; 75 (9): 2163–2171.

Griffin DE. 2001.

Measles Virus. in: *Fields' Virology*. Hg. Knipe DM, Howley PM. 4. Aufl. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2001. 1401–1442.

Hahm B, Arbour N, Nanche D, Homann D, Manchester M, Oldstone MB. 2003.

Measles virus infects and suppresses proliferation of T lymphocytes from transgenic mice bearing human signaling lymphocytic activation molecule. *J Virol.* 2003; 77 (6): 3505–3515.

Hahm B, Arbour N, Oldstone MB. 2004.

Measles virus interacts with human SLAM receptor on dendritic cells to cause immunosuppression. *Virology.* 2004; 323 (2): 292–302.

Hamalainen H, Meissner S, Lahesmaa R. 2000.

Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) is differentially expressed in human Th1 and Th2 cells. *J Immunol Methods.* 2000; 242 (1–2): 9–19.

Harcourt BH, Rota PA, Hummel KB, Bellini WJ, Offermann MK. 1999.

Induction of intercellular adhesion molecule 1 gene expression by measles virus in human umbilical vein endothelial cells. *J Med Virol.* 1999; 57 (1): 9–16.

Hashimoto K, Ono N, Tatsuo H, Minagawa H, Takeda M, Takeuchi K, Yanagi Y. 2002.

SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol.* 2002; 76 (13): 6743–6749.

Horikami SM, Moyer SA. 1995.

Structure, Transcription, and Replication of Measles Virus. in: *Measles Virus*. Hg. ter Meulen V & Billeter MA. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. 35–50.

Hsu EC, Sarangi F, Iorio C, Sidhu MS, Udem SA, Dillehay DL, Xu W, Rota PA, Bellini WJ, Richardson CD. 1998.

A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells. *J Virol.* 1998; 72 (4): 2905–2916.

Hsu EC, Iorio C, Sarangi F, Khine AA, Richardson CD. 2001.

CDw150 (SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology.* 200; 279 (1): 9–21.

Huber M, Cattaneo R, Spielhofer P, Orvell C, Norrby E, Messerli M, Perriard JC, Billeter MA. 1991.

Measles virus phosphoprotein retains the nucleocapsid protein in the cytoplasm. *Virology*. 1991; 185 (1): 299–308.

Hummel KB, Bellini WJ, Offermann MK. 1998.

Strain-specific differences in LFA-1 induction on measles virus-infected monocytes and adhesion and viral transmission to endothelial cells. *J Virol*. 1998; 72 (10): 8403–8407.

International Committee on Taxonomy of Viruses. 2002.

ICTVdB Index of Viruses. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/ICTVdb/ICTVdb/01.048.htm>, aufgerufen am 06.09.2006.

Isaacson SH, Asher DM, Godec MS, Gibbs CJ Jr, Gajdusek DC. 1996.

Widespread, restricted low-level measles virus infection of brain in a case of subacute sclerosing panencephalitis. *Acta Neuropathol (Berl)*. 1996; 91 (2): 135–139.

Jaffe EA, Nachman RL, Becker CG, Minick CR. 1973.

Culture of human endothelial cells derived from umbilical veins. Identification by morphologic and immunologic criteria. *J Clin Invest*. 1973; 52 (11): 2745–2756.

Johnston IC, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S. 1999.

A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism. *J Virol*. 1999; 73 (8): 6903–6915.

Kallstrom H, Liszewski MK, Atkinson JP, Jonsson AB. 1997.

Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic *Neisseria*. *Mol Microbiol*. 1997; 25 (4): 639–647.

Katz M. 1995.

Clinical Spectrum of Measles. in: *Measles Virus*. Hg. ter Meulen V & Billeter MA. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 1995. 1–12.

Kimura A, Tosaka K, Nakao T. 1975.

Measles rash. I. Light and electron microscopic study of skin eruptions. *Arch Virol*. 1975; 47 (4): 295–307.

Kirk J, Zhou AL, McQuaid S, Cosby SL, Allen IV. 1991.

Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis: ultrastructural and in situ hybridization evidence. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 1991; 17: 289–297.

Laemmli UK. 1970.

Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970; 227 (5259): 680–685.

Langmuir AD. 1962.

Medical importance of measles. *Am J Dis Child.* 1962; 103: 224–226.

Langmuir AD, Henderson DA, Serfling RE, Sherman IL. 1962.

The importance of measles as a health problem. *Am J Public Health.* 1962; 52 (2) Supplement: 1–4.

Lawrence DM, Patterson CE, Gales TL, D’Orazio JL, Vaughn MM, Rall GF. 2000.

Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production. *J Virol.* 2000; 74 (4): 1908–1918.

Lecouturier V, Fayolle J, Caballero M, Carabana J, Cekma ML, Fernandez-Munoz R, Wild TF, Buckland R. 1996.

Identification of two amino acids in the hemagglutinin glycoprotein of measles virus (MV) that govern hemadsorption, HeLa cell fusion, and CD46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. *J Virol.* 1996; 70 (7): 4200–4204.

Li K, Feito MJ, Sacks SH, Sheerin NS. 2006.

CD46 (membrane cofactor protein) acts as a human epithelial cell receptor for internalization of opsonized uropathogenic *Escherichia coli*. *J Immunol.* 2006; 177 (4): 2543–2551.

Liszewski MK, Post TW, Atkinson JP. 1991.

Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol.* 1991; 9: 431–455.

Loveland BE, Johnstone RW, Russell SM, Thorley BR, McKenzie IF. 1993.

Different membrane cofactor protein (CD46) isoforms protect transfected cells against antibody and complement mediated lysis. *Transpl Immunol.* 1993; 1 (2): 101–108.

Maldonado Y. 2000.

Measles. in: *Nelson textbook of pediatrics.* Hg. Behrman RE, Kliegman RM, Jenson HB. 16. Aufl. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 2000. 946–951.

Manchester M, Liszewski MK, Atkinson JP, Oldstone MBA. 1994.

Multiple isoforms of CD46 (membrane cofactor protein) serve as receptors for measles virus. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1994; 91: 2161–2165.

Manchester M, Valsamakis A, Kaufman R, Liszewski MK, Alvarez J, Atkinson JP, Lublin DM, Oldstone MB. 1995.

Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). *Proc Natl Acad Sci USA*. 1995; 92 (6): 2303–2307.

Manchester M, Naniche D, Stehle T. 2000a.

CD46 as a measles receptor: form follows function. *Virology*. 2000; 274 (1): 5–10.

Manchester M, Eto DS, Valsamakis A, Liton PB, Fernandez-Munoz R, Rota PA, Bellini WJ, Forthal DN, Oldstone MB. 2000b.

Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *J Virol*. 2000; 74 (9): 3967–3974.

Marin V, Kaplanski G, Gres S, Farnarier C, Bongrand P. 2001.

Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cells. *J Immunol Methods*. 2001; 254 (1-2): 183–190.

Marttila M, Persson D, Gustafsson D, Liszewski MK, Atkinson, Wadell G, Arnberg N. 2005.

CD46 is a cellular receptor for all species B adenoviruses except types 3 and 7. *J Virol*. 2005; 79 (22): 14429–14436.

Mavaddat N, Mason DW, Atkinson PD, Evans EJ, Gilbert RJ, Stuart DI, Fennelly JA, Barclay AN, Davis SJ, Brown MH. 2000.

Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity. *J Biol Chem*. 2000; 275 (36): 28100–28109.

Mazure G, Grundy JE, Nygard G, Hudson M, Khan K, Srail K, Dhillon AP, Pounder RE, Wakefield AJ. 1994.

Measles virus induction of human endothelial cell tissue factor procoagulant activity in vitro. *J Gen Virol*. 1994; 75 (11): 2863–2871.

McChesney MB, Miller CJ, Rota PA, Zhu YD, Antipa L, Lerche NW, Ahmed R, Bellini WJ. 1997.

Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology*. 1997; 233 (1): 74–84.

McLean DM, Best JM, Smith PA, Larke RP, McNaughton GA. 1966.

Viral infections of Toronto children during 1965: II. Measles encephalitis and other complications. *Can Med Assoc J.* 94 (17): 905–910.

McNeill WH. 1976.

Plagues and Peoples. New York: Anchor Books, 1976.

McQuaid S, Campbell S, Wallace IJ, Kirk J, Cosby SL. 1998.

Measles virus infection and replication in undifferentiated and differentiated human neuronal cells in culture. *J Virol.* 1998; 72 (6): 5245–5250.

McQuaid S, Cosby SL. 2002.

An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis. *Lab Invest.* 2002; 82 (4): 403–409.

Meissner NN, Koschel K. 1995.

Downregulation of endothelin receptor mRNA synthesis in C6 rat astrocytoma cells by persistent measles virus and canine distemper virus infections. *J Virol.* 1995; 69 (8): 5191–5194.

Minagawa H, Tanaka K, Ono N, Tatsuo H, Yanagi Y. 2001.

Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol.* 2001; 82 (12): 2913–2917.

Moench TR, Griffin DE, Obriecht CR, Vaisberg AJ, Johnson RT. 1988.

Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA. *J Infect Dis.* 1988; 158 (2): 433–442.

Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rabourdin-Combe C, Gerlier D. 1993.

Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol.* 1993; 67 (10): 6025–6032.

Nichols KE, Ma CS, Cannons JL, Schwartzberg PL, Tangye SG. 2005.

Molecular and cellular pathogenesis of X-linked lymphoproliferative disease. *Immunol Rev.* 2005; 203: 180–199.

Norrby E, Kovamees J, Blixenkron-Moller M, Sharma B, Orvell C. 1992.

Humanized animal viruses with special reference to the primate adaptation of morbillivirus. *Vet Microbiol.* 1992; 33 (1–4): 275–286.

Pardridge WM. 1999.

Blood-brain barrier biology and methodology. *J Neurovirol.* 1999; 5 (6): 556–569.

Ogata A, Czub S, Ogata S, Cosby SL, McQuaid S, Budka H, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. 1997.

Absence of measles virus receptor (CD46) in lesions of subacute sclerosing panencephalitis brains. *Acta Neuropathol (Berl).* 1997; 94 (5): 444–449.

Oglesby TJ, Allen CJ, Liszewski MK, White DJ, Atkinson JP. 1992.

Membrane cofactor protein (CD46) protects cells from complement-mediated attack by an intrinsic mechanism. *J Exp Med.* 1992; 175 (6):1547–1551.

Ohgimoto S, Ohgimoto K, Niewiesk S, Klagge IM, Pfeuffer J, Johnston IC, 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.* 2001; 82 (8): 1835–1844.

Ohno S, Seki F, Ono N, Yanagi Y. 2003.

Histidine at position 61 and its adjacent amino acid residues are critical for the ability of SLAM (CD150) to act as a cellular receptor for measles virus. *J Gen Virol.* 2003; 84 (9): 2381–2388.

Okada N, Liszewski MK, Atkinson JP, Caparon M. 1995.

Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1995; 92 (7): 2489–2493.

Ono N, Tatsuo H, Tanaka K, Minagawa H, Yanagi Y. 2001a.

V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J Virol.* 2001; 75 (4): 1594–1600.

Ono N, Tatsuo H, Hidaka Y, Aoki T, Minagawa H, Yanagi Y. 2001b.

Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J Virol.* 2001;75 (9): 4399–4401.

Panum PL. 1938.

Observations made during the epidemic of measles on the Faroe Islands in the year 1846. *Med Classics.* 1938; 3: 829–886.

Polacino PS, Pinchuk LM, Sidorenko SP, Clark EA. 1996.

Immunodeficiency virus cDNA synthesis in resting T lymphocytes is regulated by T cell activation signals and dendritic cells. *J Med Primatol.* 1996; 25 (3): 201–209.

Pschyrembel. 1998.

Nabelschnur. in: Pschyrembel Klinisches Wörterbuch. Bearbeitet von der Wörterbuch-Redaktion des Verlags unter der Leitung von Helmut Hildebrandt. 258., neu bearbeitete Aufl. Berlin: de Gruyter, 1998. 1077.

Riley-Vargas RC, Gill DB, Kemper C, Liszewski MK, Atkinson JP. 2004.

CD46: expanding beyond complement regulation. Trends Immunol. 2004; 25 (9): 496–503.

Rima BK, Earle JA, Baczko K, ter Meulen V, Liebert UG, Carstens C, Carabana J, Caballero M, Celma ML, Fernandez-Munoz R. 1997.

Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. J Gen Virol. 1997; 78 (1): 97–106.

Robert-Koch-Institut. 2000a.

Ein aktueller Masern-Ausbruch in Irland. Epidemiologisches Bulletin. 2000; 7: 57.

Robert-Koch-Institut. 2000b.

Aktueller Masern-Ausbruch in Irland — Update. Epidemiologisches Bulletin. 2000; 19: 154.

Robert-Koch-Institut. 2002a.

Zu den aktuellen Masern-Ausbrüchen in Deutschland. Epidemiologisches Bulletin. 2002; 12: 101–102.

Robert-Koch-Institut. 2002b.

Zu einer Masern-Epidemie im Süden Italiens. Epidemiologisches Bulletin. 2002; 24: 199.

Robert-Koch-Institut. 2002c.

Jahresbericht „Impfpräventable Krankheiten 2001“, Teil 1. Epidemiologisches Bulletin. 2002; 42: 349–353.

Robert-Koch-Institut. 2003.

Update: Masernepidemie 2002 in Italien. Epidemiologisches Bulletin. 2003; 1: 4–5.

Robert-Koch-Institut. 2005a.

Infektionsgeschehen von besonderer Bedeutung. Epidemiologisches Bulletin. 2005; 4: 30.

Robert-Koch-Institut. 2005b.

Zu einem Ausbruch von Masern in Hessen. Epidemiologisches Bulletin. 2005; 11: 98.

Robert-Koch-Institut. 2005c.

Zu einer aktuellen Häufung von Masern in Wiesbaden. *Epidemiologisches Bulletin*. 2005; 20: 178–179.

Robert-Koch-Institut. 2006.

Masern im Jahr 2005 und Ausbrüche in Baden-Württemberg und Nordrhein-Westfalen in der ersten Hälfte des Jahres 2006. *Epidemiologisches Bulletin*. 2006; 27: 205–211.

Rolleston JD. 1937.

The history of the acute exanthemata. London: William Heinemann, 1937.

Rose A. 2003.

Measles eliminated in Finland since 1996 — will it last? *Eurosurveillance Weekly*. 2003; 1 (3): 030116. <http://www.eurosurveillance.org/ew/2003/030116.asp#2>, aufgerufen am 04.09.2006.

Rubin LL, Staddon JM. 1999.

The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu Rev Neurosci*. 1999; 22: 11–28.

Saiki RK, Scharf S, Faloona F, Mullis KB, Horn GT, Erlich HA, Arnheim N. 1985.

Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science*. 1985; 230 (4732):1350–1354.

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. 1989.

Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2. Aufl. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

Santoro F, Kennedy PE, Locatelli G, Malnati MS, Berger EA, Lusso P. 1999.

CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. *Cell*. 1999; 99 (7): 817–827.

Schneider-Schaulies J, Schnorr JJ, Brinckmann U, Dunster LM, Bacsko K, Liebert UG, 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 USA*. 1995; 92: 3943–3947.

Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Kobune F, Rima B, ter Meulen V. 1995b.

Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J Virol*. 1995; 69 (11): 7257–7259.

Schnorr JJ, Dunster LM, Nanan R, Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S, ter Meulen V. 1995.

Measles virus-induced down-regulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur J Immunol.* 1995; 25 (4): 976–984.

Schuster V, Kreth HW. 2001.

Virusinfektionen. in: Pädiatrie. Hg. Speer CP, Gahr M. Berlin/Heidelberg: Springer-Verlag, 2001. 359–409.

Segerman A, Atkinson JP, Marttila M, Dennerquist V, Wadell G. 2003.

Adenovirus type 11 uses CD46 as a cellular receptor. *J Virol.* 2003; 77 (17): 9183–9191.

Seya T, Hara T, Matsumoto M, Akedo H. 1990.

Quantitative analysis of membrane cofactor protein (MCP) of complement. High expression of MCP on human leukemia cell lines, which is down-regulated during cell differentiation. *J Immunol.* 1990; 145 (1): 238–245.

Sidorenko SP, Clark EA. 1993.

Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes. *J Immunol.* 1993; 151 (9): 4614–4624.

Sidorenko SP, Clark EA. 2003.

The dual-function CD150 receptor subfamily: the viral attraction. *Nat Immunol.* 2003; 4 (1): 19–24.

Snyder MJ, McCrumb FR Jr, Bigbee T, Schluederberg AE, Togo Y. 1962.

Observations on the seroepidemiology of measles. *Am J Dis Child.* 1962; 103: 250–251.

Soilu-Hänninen M, Hänninen A, Ilonen J, Salmi A, Salonen R. 1996.

Measles virus hemagglutinin mediates monocyte aggregation and increased adherence to measles-infected endothelial cells. *Med Microbiol Immunol (Berl).* 1996; 185 (2): 73–80.

Staubesand J. 1994.

Bau und Funktion der Blutgefäße (Vasa sanguinea). in: Benninghoff A: Anatomie. Hg. Drenckhahn D & Zenker W. Band 1. 15. Aufl. München/Wien/Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1994. 652–685.

Stins MF, Badger J, Sik Kim K. 2001.

Bacterial invasion and transcytosis in transfected human brain microvascular endothelial cells. *Microb Pathog.* 2001; 30 (1): 19–28.

Takeuchi K, Takeda M, Miyajima N, Kobune F, Tanabayashi K, Tashiro M. 2002.

Recombinant wild-type and edmonston strain measles viruses bearing heterologous H proteins: role of H protein in cell fusion and host cell specificity. *J Virol.* 2002; 76 (10): 4891–4900.

Tanaka K, Xie M, Yanagi Y. 1998.

The hemagglutinin of recent measles virus isolates induces cell fusion in a marmoset cell line, but not in other CD46-positive human and monkey cell lines, when expressed together with the F protein. *Arch Virol.* 1998; 143 (2): 213–225.

Tanaka K, Minagawa H, Xie MF, Yanagi Y. 2002.

The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150). *Arch Virol.* 2002; 147 (1): 195–203.

Tatsuo H, Okuma K, Tanaka K, Ono N, Minagawa H, Takade A, Matsuura Y, Yanagi Y. 2000a.

Virus entry is a major determinant of cell tropism of Edmonston and wild-type strains of measles virus as revealed by vesicular stomatitis virus pseudotypes bearing their envelope proteins. *J Virol.* 2000; 74 (9): 4139–4145.

Tatsuo H, Ono N, Tanaka K, Yanagi Y. 2000b.

SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.* 2000; 406 (6798): 893–897.

ter Meulen V, Muller D, Kackell Y, Katz M, Meyermann R. 1972.

Isolation of infectious measles virus in measles encephalitis. *Lancet.* 2 (7788): 1172–1175.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. 1979.

Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1979; 76 (9): 4350–4354.

Urbanska EM, Chambers BJ, Ljunggren HG, Norrby E, Kristensson K. 1997.

Spread of measles virus through axonal pathways into limbic structures in the brain of TAP1 $-/-$ mice. *J Med Virol.* 1997; 52 (4): 362–369.

Varior-Krishnan G, Trescol-Biemont MC, Nanche D, Rabourdin-Combe C, Gerlier, D. 1994.

Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms of CD46 display similar measles virus receptor properties: virus binding, fusion, and replication; down-regulation by hemagglutinin; and virus uptake and endocytosis for antigen presentation by major histocompatibility complex class II molecules. *J Virol.* 1994; 68 (12): 7891–7899.

Weissbrich B, Schneider-Schaulies J, ter Meulen V. 2003.

Measles and its neurological complications. in: Clinical Neurovirology. Hg. Nath A, Berger JR. New York: Marcel Dekker, 2003. 401–430.

Welstead GG, Hsu EC, Iorio C, Bolotin S, Richardson CD. 2004.

Mechanism of CD150 (SLAM) down regulation from the host cell surface by measles virus hemagglutinin protein. J Virol. 2004; 78 (18): 9666–9674.

World Health Organization. 2001.

Measles — Mortality Reduction and Regional Elimination. Strategic Plan 2001–2005. New York: World Health Organization, 2001.

World Health Organization. 2002.

Deaths by cause, sex and mortality stratum in WHO regions, estimates for 2001. The World Health Report 2002, Annex Table 2. New York: World Health Organization, 2002. 186–191.

Xie M, Tanaka K, Ono N, Minagawa H, Yanagi Y. 1999.

Amino acid substitutions at position 481 differently affect the ability of the measles virus hemagglutinin to induce cell fusion in monkey and marmoset cells co-expressing the fusion protein. Arch Virol. 1999; 144 (9): 1689–1699.

Yanagihara M, Fujii T, Mochizuki T, Ishizaki H, Sata T. 1998.

Measles virus was present in the inner cell of the acrosyngium in the skin rash. Pediatr Dermatol. 1998; 15 (6): 456–458.

Zenker W. 1993a.

Feinstruktur des Nervengewebes. in: Benninghoff A: Anatomie. Hg. Drenckhahn D & Zenker W. Band 2. 15. Aufl. München/Wien/Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1993. 220–266.

Zenker W. 1993b.

Hüllen des Zentralnervensystems, Ventrikelauskleidung und Liquor cerebrospinalis. in: Benninghoff A: Anatomie. Hg. Drenckhahn D & Zenker W. Band 2. 15. Aufl. München/Wien/Baltimore: Urban & Schwarzenberg, 1993. 339–360.

Danksagung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde in der Zeit von Oktober 1999 bis September 2001 am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt. Mein besonderer Dank gilt dabei Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Schneider-Schaulies für die Überlassung des attraktiven und spannenden Themas, das geschenkte Vertrauen und die kollegiale wissenschaftliche Betreuung.

Für die Übernahme des Koreferats möchte ich Herrn Prof. Dr. med. Peter Friedl, PhD, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und die finanzielle Unterstützung zum Besuch von Tagungen, Symposien und Meetings Herrn Prof. em. Dr. med. Volker ter Meulen herzlich danken. Auch der Deutschen Forschungsgemeinschaft, die das Projekt seit Dezember 2000 als Einzelförderung (DFG 216545) und seit Januar 2002 innerhalb des Schwerpunktprogramms 1130 "Infektionen des Endothels" (DFG SCHN 320/9–1) unterstützt, gebührt mein Dank.

Meinen Kollegen Frau Franziska Dimpfel, Frau Sieglinde Löffler, Frau Dr. rer. nat. Kerstin Möller-Ehrlich, Frau Dr. rer. nat. Karola Obojes, Frau Katrin Singethan, Herrn Dr. rer. nat. Christian Erlenhöfer und Herrn Dr. rer. nat. Erik Schmid danke ich für die hilfsbereite Einarbeitung und das freundliche Arbeitsklima. Den Arbeitsgruppen von Frau Prof. Dr. rer. nat. Sibylle Schneider-Schaulies und Herrn Prof. Dr. med. vet. Stefan Niewiesk bin ich für die wertvolle und konstruktive Zusammenarbeit sehr verbunden.

Von Herrn Dr. med. Winfried Ness und Frau Agnes Weth aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Detlev Drenckhahn lernte ich die Isolation von Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene und von Frau Dr. rer. nat. Vera Hummel aus der Arbeitsgruppe von Herrn Prof. Dr. med. Peter Rieckmann die Methode zur Gewinnung von primären Endothelzellen aus humanem Hirngewebe. Die Abteilung für Geburtshilfe

Danksagung

der Universitäts-Frauenklinik Würzburg war mir bei der Bereitstellung von humanen Nabelschnüren behilflich. Die humane Hirndothelzelllinie HBMEC ist eine freundliche Gabe von Herrn Prof. Kwang Sik Kim, MD. Allen Kooperationspartnern sei an dieser Stelle ausdrücklich gedankt.

Gewidmet ist die Dissertation meinen Eltern Karl Heinrich und Annette, die mir das Medizinstudium und die experimentelle Forschungsarbeit zur Promotion ermöglicht haben, sowie meiner Frau Kerstin und meiner kleinen Tochter Anna, die mich in den vergangenen Monaten vor Einreichung der Dissertation so tatkräftig unterstützt haben und sehr viel gemeinsame Zeit entbehren mussten.

Curriculum vitae

Oliver Rainer Andres

geboren am 1. November 1974 in Aschaffenburg

seit 03.2005 *Weiterbildung zum Facharzt für Kinder- und Jugendmedizin*
Kinderklinik und Poliklinik, Universitätsklinikum Würzburg

10.1999–09.2001 *experimentelle Forschungsarbeit zur Promotion*
Institut für Virologie und Immunbiologie, Universität Würzburg

03.1996–04.1998 *Medizinstudium und Approbation*
Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg

23.03.1998 *Ärztliche Vorprüfung*

04.1998–11.2004 Bayerische Julius-Maximilians-Universität Würzburg

31.08.1999 *Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*

10.09.2003 *Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*

19.11.2004 *Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung*

08.12.2004 *Approbation als Arzt*

10.1998–10.2000 *universitäres Studienelement Anglikum*
Zentrum für Sprachen, Universität Würzburg

12.2003–02.2004 *klinisch-praktische Auslandserfahrungen*
Department of Pediatrics, New York University

04.2004–05.2004 Nuffield Department of Clinical Medicine, University of Oxford

Wehrersatzdienst

01.1995–01.1996 Zentral-OP der Kopflinik, Universität Heidelberg

Schulbildung

09.1981–08.1985 Johannes-Obernburger-Grundschule Obernburg

09.1985–07.1994 Julius-Echter-Gymnasium Elsenfeld

01.07.1994 *allgemeine Hochschulreife*

Oliver Andres

Würzburg, Dezember 2006