

Aus dem
Institut für Virologie und Immunbiologie der
Bayerischen Julius-Maximilians-Universität zu Würzburg
Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

Masernvirus-induzierte Blockade der transendothelialen
Migration von Leukozyten und infektionsvermittelte
Virusausbreitung durch Endothelzellschichten

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

vorgelegt von
Sandra Dittmar
geb. Hammerschmidt

aus Alpenrod, Westerwald

Würzburg, 2008

Eingereicht am:.....
bei der Fakultät für Chemie und Pharmazie

1. Gutachter:
2. Gutachter:
der Dissertation

1. Prüfer:
2. Prüfer:
3. Prüfer:
des Öffentlichen Promotionskolloquiums

Tag des Öffentlichen Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

„Die Kräfte des Lebens können sich nur am Überwinden von Widerständen entfalten.“

Max Piperek

Inhaltsverzeichnis

	Seite	
1	Einleitung	9
1.1.	Die Krankheit Masern	9
1.1.1	Historische Übersicht	9
1.1.2	Epidemiologie	10
1.1.3	Akute Masern	11
1.1.4	Komplikationen und Neurovirulenz bei Masern	12
1.2	Das Masernvirus	14
1.2.1	Taxonomische Einordnung und Morphologie	14
1.2.2	Morphologie	14
1.2.3	Funktion der viralen Proteine	15
1.2.4	Genomaufbau und Replikation	17
1.2.5	Zelluläre Rezeptoren für MV	19
1.3	Das vaskuläre Endothel	21
1.3.1	Funktionen des Endothels	21
1.3.2	Leukozytenmigration	22
1.3.3	Spezifische Endothelzellmarker	24
1.3.4	Blut-Hirn-Schranke	24
1.4	Ziele dieser Arbeit	25
2	Material	26
2.1	Zellen	26
2.2	Viren	27
2.3	Antikörper	28
2.3.1	monoklonale Antikörper	28
2.3.2	sekundäre Antikörper	31
2.3.3	Antikörperseren	31
2.4	Zytokine, Mediatoren	32

2.5	Nachweis des endothelspezifischen Markers Ulex-europaeus-Agglutinin 1	32
2.6	Enzyme	33
2.7	Nährmedium und Seren	33
2.8	Lösungen und Puffer	34
2.9	Chemikalien und Antibiotika	37
2.10	Ein- und Mehrwegmaterialien	41
2.11	Apparaturen und Geräte	44
3	Methoden	47
3.1	Zellbiologische Methoden	47
3.1.1	Gewinn von Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnur	47
3.1.2	Passagieren von Zellen	48
3.1.3	Zellkultur adhärenter Zellen	49
3.1.4	Einfrieren und Auftauen von Zellen	50
3.1.5	Bestimmung der Lebendzellzahl	50
3.1.6	Isolierung humaner primärer mononukleärer Zellen	51
3.2	Virologische Methoden	52
3.2.1	Virusvermehrung	52
3.2.2	Ultrazentrifugation von MV-Präparationen	52
3.2.3	Plaque-Test	53
3.2.4	Virustiterbestimmung durch Endpunktiteration	53
3.2.5	Inaktivierung von Masernviren	54
3.3.	Histo- und zytochemische Methoden	54
3.3.1	Herstellung von MOWIOL®4.88	54
3.3.2	Immunfluoreszenzfärbungen	54
3.3.3	Durchflusszytometrie	55
3.3.4	Oberflächenfärbungen	56
3.3.5	Fluorometrische Messung der Adhärenz von PBMCs auf HBMECs	56
3.3.6	Fluorometrische Messung der Permeabilität mit FITC-Dextran	57
3.4	Proteinbiochemische Methoden	58
3.4.1	Bestimmung der Proteinkonzentration	58

3.4.2	Herstellung von Zelllysaten	58
3.4.3	Biotinylierung von auf Filtern gewachsenen Zellen	59
3.4.4	Immunpräzipitation	59
3.4.5	Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)	59
3.4.6	Western-Blot	61
4	Ergebnisse	63
4.1	Charakterisierung von Endothelzellen	63
4.1.1	Expression von Endothelzellmarkern und Adhäsionsmolekülen	63
4.1.2	Überprüfung der Polarisierung von Endothelzellen	64
4.1.3	Nachweis des ZO-1 Proteins in HBMECs	65
4.1.4	Überprüfung der Permeabilität von HBMECs	66
4.1.5	Expression von E-Selektin (CD62), VCAM (CD106) und ICAM (CD54)	69
4.2	Effekt der MV-Infektion auf die T-Zell Migration	70
4.2.1	Charakterisierung der Stimulation durch Nachweis von CD69	70
4.2.2	Charakterisierung der CD150 Expression	71
4.2.3	Bestimmung der infizierten T-Zellen in Prozent	72
4.2.4	Bestimmung der absoluten und prozentualen Anzahl an infizierten T-Zellen aus der apikalen und basolateralen Filterkammer	73
4.2.5	Bestimmung der Anzahl an toten Zellen nach Infektion	74
4.2.6	Transmigration von PBMCs durch Transwellfilter ohne EZ	76
4.2.7	Transmigration von PBMCs durch Transwellfilter mit EZ	78
4.3	Adhäsion von infizierten Leukozyten auf die Endothelzellen	80
4.3.1	Berechnung der adhärenzierten uninfizierten und infizierten T-Zellen aus den Transmigrationsversuchen	80
4.3.2	Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von infizierten PBMCs	82
4.4	Effekte der Infektion auf die Adhäsionsrezeptoren	84
4.4.1	Untersuchung der LFA-1 und VLA-4 Expression	84
4.4.2	Messung der CCR1/CCR2/ und CCR5 Expression	88
4.5	Ausbildung von „transmigratory cups“ (docking-Struktur) bei Kontakt eines Leukozyten mit einer Endothelzelle	90

4.5.1	Ausbildung von „transmigratory cups“ zwischen MV-infizierten T-Zellen und Endothelzellen	92
4.5.2	Doppelfärbung mit LFA-1 bzw. VLA-4 und ICAM-1 bzw. VCAM-1.	94
4.6	Infektion von Endothelzellen nach Adhäsion von Leukozyten	95
4.6.1	Weiterkultivierung der infizierten HBMECs	96
4.6.2	ZO-1 Kontrolle von MV infizierten konfluenten HUVECs	97
4.7	Virusfreisetzung von polarisierten Endothelzellen	98
4.7.1	Untersuchung der gerichteten Hüllproteinexpression mittels Immunfluoreszenz	98
4.7.2	Bestimmung der Virusfreisetzung mittels Plaque-Test	99
4.8	Einfluss der zytoplasmatischen Sortierungssignale auf die Expression der viralen Hüllproteine in Endothelzellen	100
4.8.1	Untersuchung der apikalen und basolateralen Verteilung der MV-H und MV-F Glykoproteine mittels Immunpräzipitation	100
4.8.2	Untersuchung der MV-Freisetzung	103
4.8.3	Virus-induzierte Zell-Zell-Fusion polarisierter Endothelzellen	104
5	Diskussion	106
5.1	Die Rolle von Gefäßendothelzellen bei der Pathogenese einer Masernvirusinfektion	106
5.2	Auswahl des Zellkulturmodells	107
5.3	MV-induzierte Blockierung der transendothelialen Migration von Leukozyten und Erhöhung der Integrinexpression	108
5.4	Basolaterale Virusfreisetzung benötigt zytoplasmatische Transportsignale der MV-H- und F-Proteine	112
	Zusammenfassung	115
	Summary	116
	Abkürzungen	117

Abbildungen und Tabellen	123
Literatur	127
Danksagung	145

1. Einleitung

1.1 Die Krankheit Masern

1.1.1 Historische Übersicht

Der Name „Morbilli“ (Verkleinerungsform von lat. morbus, plural) für Masern stammt aus dem Mittelalter, da es im Vergleich zu den Pocken als „kleinere Krankheit“ angesehen wurde (George Rosen, 1958). Die erste Aufzeichnung über die Masern stammt von dem persischen Arzt Rhazes im 10. Jahrhundert. Er konnte die Masern von den Pocken deskriptiv und klinisch unterscheiden. Im 18. Jahrhundert erkannte Francis Home, ein schottischer Arzt, Masern als hochansteckendes Agens. Er unternahm die ersten vergeblichen Versuche einer Impfung gegen die Masernerkrankung, indem er infizierten Personen Blut abnahm und versuchte, zwölf Kinder damit zu immunisieren. Zehn von diesen Kindern bekamen die Symptome einer Masernerkrankung.

Über die Übertragung von Masern auf Affen wurde zum ersten Mal von Josias 1898 berichtet (Norby und Oxman, 1990). 1911 wiederholten Goldberger und Anderson diesen Versuch und bestätigten die Ätiologie des Virus (Anderson und Goldberger, 1911). 1954 isolierten und propagierten Enders und Peebles das Masernvirus (Enders und Peebles 1954). Aufgrund dieser Entdeckung brachten detaillierte Analysen Informationen z. B. über die Virusstruktur und Replikation. Darauf folgte dann 1958 die Entwicklung des ersten Impfstoffes. Man fand auch heraus, dass neben der akuten Masernerkrankung das Virus im ZNS persistieren und zu einer nicht ansteckenden, progressiven Enzephalitis führen kann (Norby und Oxman, 1990).

1.1.2 Epidemiologie

Trotz vorhandenem Impfstoff gehören die Masern immer noch zu einer der gefährlichsten Infektionskrankheiten, die sogar tödlich sein können. Für Masern gibt es keine ursächliche Behandlung, sie können nur durch Impfung verhindert werden. Der strategische Plan von 2001 - 2005 der WHO und Unicef sah vor, die Zahl der Todesfälle bis zum Jahr 2005 durch verstärkte Impfkampagnen zu reduzieren (WHO 2001). Dem Bericht vom Jan. 2007 der WHO ist zu entnehmen, dass große Erfolge zu verzeichnen sind. Weltweit konnte die Anzahl der Todesfälle nach einer Masernerkrankung seit 1999 bis 2005 um 60 % reduziert werden, d. h. die Zahl sank von 873.000 in 1999 auf 345.000 in 2005. Alleine in den westpazifischen Ländern konnte die Anzahl um 82 % vermindert werden. Dieses Ergebnis zeigt, dass das Ziel der Masernausrottung in 2012 in den westpazifischen Ländern erreicht werden kann (WHO 2007). Auch alle 52 Mitgliedstaaten der WHO-Region Europa haben sich mit der Resolution der WHO EUR/RC55/R7 dem Ziel der Eliminierung von Masern und Röteln bis zum Jahr 2012 verpflichtet. Das Treffen der deutschsprachigen Staaten in Berlin im Mai 2006 hat gezeigt, dass zusätzliche Maßnahmen getroffen werden müssen, um das Ziel der WHO, die Masern bis zum Jahr 2012 auszurotten, zu erreichen. Die für die Eliminierung der Masern erforderliche Impfquote von 95 % ist noch nicht erreicht (Robert-Koch-Institut 2006 a). Die Anzahl an Masernerkrankungen nahm in den Jahren von 2001 bis 2004 von 6037 auf 122 Fälle drastisch ab. Es gibt aber immer wieder regionale Ausbrüche wie z. B. in Nordrhein-Westfalen 2006, wodurch die Fälle an Erkrankungen von 2004 auf 2006 um 95 % anstieg, seit 2007 Tendenz sinkend. Die unterdurchschnittlichen Impfraten insbesondere in ausländischen Subpopulationen sind mögliche Ursachen dieser Art von Ausbrüchen (Robert-Koch-Institut 2006 b).

1.1.3 Akute Masern

Die Krankheit Masern ist eine durch das Masernvirus hervorgerufene und hoch ansteckende Infektionskrankheit. Sie betrifft vor allem Kinder. Die Übertragung des Masernvirus erfolgt durch direkten Kontakt oder durch Tröpfcheninfektion. In den aktuellen Lehrbüchern findet man immer noch die Hypothese, dass das MV über die Epithelzellen der Schleimhaut des Atemtraktes oder seltener über die Bindehaut der Augen in den Körper eindringt. Das MV wird dann von Dendritischen Zellen ins lymphatische Gewebe transportiert. Von dort aus breitet es sich über die Blutbahn in das retikuloendotheliale System aus (primäre Virämie). Nach älteren Arbeiten insbesondere aus den 1970er Jahren werden Epithel- und Endothelzellen der verschiedenen Organe wie z. B. die Niere, Leber, Haut etc. infiziert (sekundäre Virämie). Eine Infektion der Endothelzellen geht einher mit vaskulärer Dilatation, erhöhter Permeabilität und Entzündung. Dies führt zu einem unterschiedlich ausgeprägten hämorrhagischen Einschlag des Exanthems.

Nach einer Inkubationszeit von 10 - 14 Tagen beginnt das *Prodromalstadium*, in dem der Erkrankte Symptome aufweist wie z. B. Schnupfen, Halsschmerzen, Heiserkeit, Müdigkeit und Appetitlosigkeit. Das Virus ist nun im Blut und verschiedenen Sekreten zu finden und hochansteckend für die Mitmenschen des Erkrankten. Während dieser Phase entstehen die sog. *Koplikschen Flecken*. Hierbei handelt es sich um leicht erhabene, gräulich-weiße Effloreszenzen mit rötlichem Vorhof an der Wangenschleimhaut gegenüber den vorderen Backenzähnen. Die Koplikschen Flecken werden als pathognomisch für eine Masernvirusinfektion angesehen.

Mit einem erneuten Fieberanstieg folgt das *Exanthemstadium*, das oft mit einer typischen Schleimhaurötung am weichen Gaumen beginnt. Das zunächst feinfleckige Exanthem tritt zuerst hinter den Ohren und an der Stirn auf, breitet sich innerhalb 3 Tagen über das Gesicht, Nacken, den Stamm, Oberschenkeln bis hin zu den Füßen aus. Begleitend treten häufig Lymphknotenschwellungen auf.

Im Rekonvaleszenzstadium klingt das Exanthem 4 Tage nach seinem Beginn bereits ab. In unkomplizierten Fällen folgt eine rasche Erholung und eine lebenslang anhaltende Immunität (Griffin 2001).

Eine spezifische antivirale Therapie gibt es nicht. Bettruhe sollte in der akuten Krankheitsphase eingehalten werden. Als symptomatische Therapie können fiebersenkende

Medikamente (Antipyretika) und Hustenmittel (Antitussiva) eingesetzt werden. Bakterielle Superinfektionen wie eine Mittelohr- (Otitis media) oder Lungenentzündung (Pneumonie) werden mit Antibiotika behandelt.

Verschiedene Studien zeigten einen günstigen Effekt der Gabe von Vitamin A auf die Komplikationsrate und Sterblichkeit. Die WHO empfiehlt die Vitamin A Gabe im Krankheitsfall in Regionen, in denen ein Vitaminmangel angenommen werden kann oder in denen die Sterblichkeitsrate über einem Prozent liegt (Griffin 2001).

1.1.4 Komplikationen und Neurovirulenz bei Masern

Die masernvirusinduzierte Immunsuppression kann bis zu 6 Monate anhalten, wodurch die Empfänglichkeit für opportunistische bakterielle und virale Sekundärinfektionen steigt (Kerdiles Y. 2005). Durchfall, Mittelohr- und Lungenentzündungen sind dabei die häufigsten Komplikationen.

Eine sehr seltene Masernform stellen die *hämorrhagischen Masern* oder *black measles* dar. Bei diesen Masern treten blutender Ausschlag (daher die Bezeichnung „Schwarze Masern“), Schleimhautblutungen aus Nase, Mund und Darm und langanhaltendem Fieber mit Krämpfen auf.

Die *akute postinfektiöse Masernenzephalitis* (APME) ist die häufigste neurologische Komplikation und tritt bei einer von 1.000 – 2.000 Maserninfektionen auf (Modrow 2003). Sie entwickelt sich nach einer Zeit von ca. 8 Tagen nach Beginn des Ausschlages, kann aber auch in der Prodromalphase oder bis spätestens 3 Wochen nach Beginn des Exanthems auftreten. Die neurologischen Symptome treten meist rasch auf und sind begleitet von Kopfschmerzen, Fieber oder zentralen Koordinationsstörungen. Die postinfektiöse Enzephalitis zeichnet sich durch Entmarkung der Myelinscheiden im Gehirn aus. Für die Ursache wird eine autoimmunologische T-Zell vermittelte Reaktion, die gegen ein Myelinprotein gerichtet ist, in Betracht gezogen (Gendelman et al. 1984). Dabei spielt die Ähnlichkeit einzelner viraler und zellulärer Proteine bzw. Epitope eine Rolle, das sog. „molecular mimicry“. Eine milde lymphozytäre Pleozytose läßt sich im Liquor häufig nachweisen.

Es können bleibende Schäden entstehen wie z. B. Verhaltensauffälligkeiten, mentale Einschränkungen, zerebrale Anfälle oder Taubheit und ca. 10 - 40 % der APME-Fälle jedoch verlaufen tödlich (Weissbricht et al. 2003).

Die *Maserneinschlusskörperchen Enzephalitis* (MIBE, *Measles Inclusion Body Encephalitis*) ist eine unheilbare, rasch zum Tod führende Komplikation (Weissbricht et al. 2003). Sie tritt bei Patienten, meist Kindern, mit massiver Immunsuppression auf. Charakteristische Symptome sind lokale Myoklonien, Konvulsion, gefolgt von Lähmungen, Koma und Stupor. Histologische Untersuchungen ergaben den Nachweis von Einschlusskörperchen mit viralem Nukleokapsid im Zellkern und Zytoplasma von Neuronen und Gliazellen.

Die *subakute sklerosierende Panencephalitis* (SSPE) ist eine seltene, langsam fortschreitende neurologische Komplikation basierend auf einer persistierenden MV-Infektion. Sie tritt im Durchschnitt 9 - 13 Jahre nach einer akuten MV-Infektion auf und kommt mit einer Häufigkeit von 1:20.000 nach Infektion mit wildtypischem MV vor (Bellini et al. 2005, Duprex & Rima 2005, Weissbricht et al. 2003).

Erste Anzeichen äußern sich durch intellektuellen Leistungsabfall und Verhaltensstörungen ohne anscheinende neurologische Zeichen. Im weiteren Verlauf der Erkrankung manifestiert sich die Symptomatik durch motorische Dysfunktion wie Dyspraxie, Konvulsionen, Aphasie und repetitive Myoklonien.

In 10 - 50 % der Fälle entwickelt sich eine Chorioretinitis mit nachfolgender Blindheit. Im fortgeschrittenen Stadium kommt es zu einer progressiven zerebralen Degeneration, die Atmung wird unregelmäßiger, der Patient wird komatös und stirbt letztendlich an einer Hyperpyrexie oder an einem kardiovaskulären Kollaps (Norrby & Kristensson 1997, Garg RK 2002).

In Biopsienmaterial von SSPE Patienten konnten von den wichtigsten Strukturproteinen von MV nur das N- und P-Protein konsequent nachgewiesen werden, die Hüllproteine fehlten. Die Einschränkung der Expression der MV-Proteine wurde anhand von Sequenzanalysen erklärt, wobei eine hohe Mutationsrate im gesamten MV-Genom, aber insbesondere im M-Gen, gefunden wurde. Für das M-Protein z. B. fehlte das Start-Codon, das das Nichtvorhandensein des M-Proteins erklärt (Cattaneo et al. 1988).

1.2 Das Masernvirus

1.2.1 Taxonomische Einordnung

Das Masernvirus ist Mitglied und Namensgeber des Genus *Morbillivirus* und gehört damit der Ordnung der *Mononegavirales*, der Familie der *Paramyxoviridae* und der Unterfamilie der *Paramyxovirinae* an. Es besitzt ein nichtsegmentiertes, durchgehendes RNA-Genom in Negativstrangorientierung, das nicht als mRNA verwendet werden kann und deshalb nicht infektiös ist. Zu dem Genus *Morbillivirus* gehören noch weitere ausschließlich tierpathogene Viren wie das Hundestaupavirus CDV, das Delphinmorbillivirus DMV, das Seehundstaupavirus PDV, das Tümmlermorbillivirus PMV, das Peste-des-petits-ruminants-Virus PPRV und das Rinderpestvirus RPV. Die aufgezählten Viren werden über die gleichen Replikationsmechanismen vermehrt und verursachen in den jeweiligen Wirten ähnliche Krankheiten.

1.2.2 Morphologie

MV sind pleomorphe Partikel mit einem Durchmesser von 100 - 300 nm. Ihre Hülle besteht aus einer Lipiddoppelschicht, den beiden viralen Oberflächenproteinen und dem mit der Membran assoziierten M (Matrix)-Protein. Die viralen Transmembranglykoproteine, das F (Fusion)-Protein und das H (Hämagglutinin)-Protein, sind in die Membran eingelagert. Im Inneren der Virionen befindet sich ein helikaler viraler Ribonukleoproteinkomplex (RNP-Komplex). Der RNP-Komplex wird von dem N (Nukleo)-Protein, dem P (Phospho)-Protein, dem L (Large)-Protein und der nicht segmentierten, einzelsträngigen RNA negativer Polarität von 16 kb Länge gebildet.

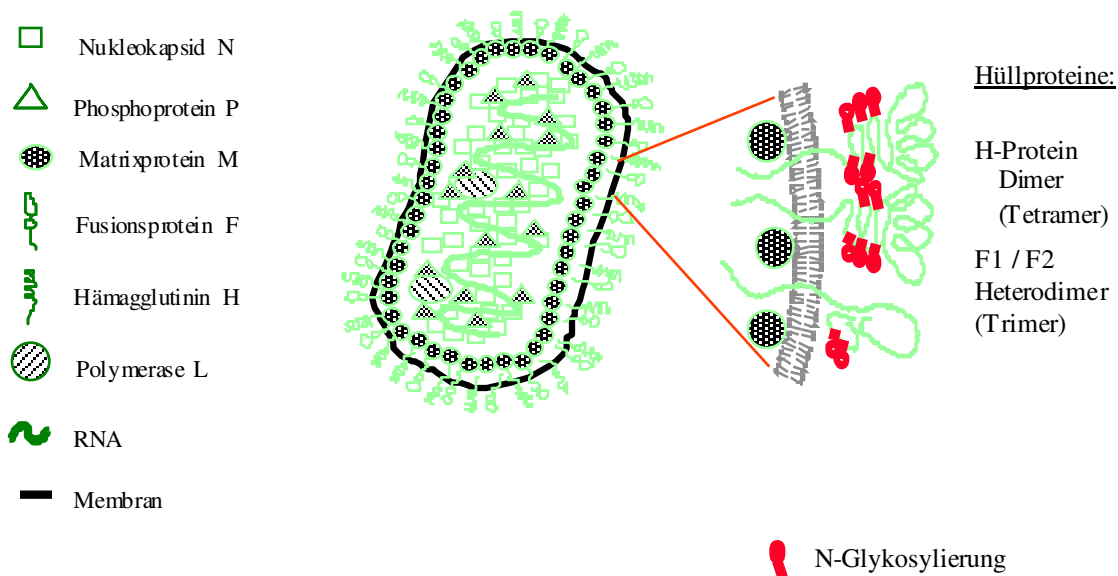


Abbildung 1.1: Schematische Abbildung eines Masernvirions mit gesonderter Auflistung der Hüllproteine (verändert nach Schneider-Schaulies et al. 2008)

1.2.3 Funktion der viralen Proteine

MV-Proteine

Beginnend am 3-Ende ist das **Nukleoprotein** (N, 60 kDa) das häufigste aller viralen Translationsprodukte und stellt auch die Hauptkomponente des Nukleokapsids dar. Über das aminoternale Ende lagert es sich an die RNA. Durch diese Verpackung wird das virale Genom vor dem Abbau durch zelluläre Nucleasen geschützt. Mit dem carboxyterminalen Ende interagiert das N-Protein mit den P- und L-Proteinen unter Ausbildung des RNP-Komplexes. Somit ist es auch an der Initiation der Transkription und Replikation viraler RNA beteiligt. Die Interaktion der M-Proteine, die mit der Zytoplasmamembran der infizierten Zelle und der Virusmembran assoziiert sind, mit dem N-Protein führt zur korrekten Faltung und Verpackung der Nukleokapside in die entstehenden Partikel.

Das **Phosphoprotein** ist das zweithäufigste Translationsprodukt. Als Transaktivator für das Protein liegt es an transkriptionsaktiven Stellen vor. Das konservierte C-terminale Ende enthält für die Transkription wichtige Bereiche, die Polymerase-Bindungs-Regionen und die

Sequenzen, die für die RNP-Bindung verantwortlich sind. Die Wechselwirkung des P-Proteins mit dem N-Protein ist für die Bindung von RNA-Molekülen bei der Replikation sowie bei der Ausbildung des Nukleokapsids notwendig (Bankamp et al. 1996). Das MVP-Gen codiert für zwei zusätzliche Proteine, das C- und das V-Protein, die zu den Nichtstrukturproteinen zählen.

Das **C-Protein** besteht aus 186 Aminosäuren und wird bei der Translation eines offenen Leserasters, das 22 Nukleotide stromabwärts des P/V Startcodons beginnt, gebildet (Richardson et al. 1985). Das C-Protein kolokalisiert mit dem RNP-Komplex und spielt eine Rolle bei der Replikation und Pathogenität des MV (Deveaux et al. 2004, Escoffier et al. 1999). Versuche zeigten, dass das MV C-Protein, in Abwesenheit anderer MV Proteine, die Induktion von IFN- α/β oder von IFN- α/β -stimulierten Genen hemmen kann (Shaffer et al. 2003).

Das **V-Protein** entsteht durch posttranskriptionales RNA-Editing der P-mRNA. Es hat die gleiche aminoternale Sequenz wie das P-Protein und besitzt am C-Terminus eine konservierte Zink-Bindungsdomäne (Paterson et al. 1995). Außerdem hemmt das V-Protein auch den Typ-I-Interferon Signalweg. Es interagiert mit vielen zellulären Proteinen, wie z. B. STAT1 und STAT2, die Schlüsselmoleküle im Zytokin-Signalweg darstellen (Palosaari et al. 2003). Durch die Bindung wird die IFN- α , - β und - γ induzierte antivirale Immunantwort des Wirtes unterbunden und das V-Protein ist somit essentiell für die Virulenz (Deveaux & Cattaneo et al. 2004).

Das **Matrixprotein** (37 kDa) ist ein kleines, nicht glykosyliertes Virusprotein, das weder ein Signalpeptid, noch eine Transmembrandomäne besitzt. Es ist an der Innenseite der Virushülle lokalisiert. Das Protein verbindet den RNP-Komplex durch Wechselwirkung mit den N-Proteinen mit der Virushülle. Zudem ist das M-Protein am Assembly der Viruspartikel beteiligt und für die apikale Freisetzung in Epithelzellen verantwortlich (Naim et al. 2000). Das M-Protein ist auch ein Inhibitor der viralen Transkription und der Zellfusion (Reuter et al. 2006). Bei persistierenden MV-Infektionen wie SSPE und MIBE wurden Mutationen insbesondere im M-Gen gefunden (Suryanarayana et al. 1994).

Das **Hämagglutininprotein** (80 kDa) ist ein Typ-II-Transmembranprotein und kommt als Tetramer auf der Virusmembran vor (Malvoisin & Wild et al. 1993). Es ist für die Bindung an die zellulären Rezeptoren verantwortlich (Stern et al. 1995). Am aminoterminalen Ende besitzt das H-Protein eine hydrophobe Sequenz, die als Signalsequenz zum Transport in das

Endoplasmatische Retikulum (ER) dient. Die Synthese und Glykosylierung erfolgt im rauhen ER (Plemper et al. 2001). Anschließend erfolgt der Transport als Dimere, die über Disulfidbrücken verbunden sind, zu weiteren Prozessierungsschritten zum Golgi-Apparat, wo es zur Modifikation der Zuckerreste kommt. Das H-Protein besitzt fünf bis sechs Glykosylierungsstellen zur Gewährleistung der optimalen Proteinfaltung und -dimerisierung und zum Transport aus dem Golgi-Apparat heraus (Hu et al. 1994). Anschließend wird es zur Zytoplasmamembran der Wirtszelle transportiert und erscheint als Tetramer auf der Virushülle.

Zusammen mit dem H-Protein dient das **Fusionsprotein** zur Verschmelzung des viralen Envelope mit der Zytoplasmamembran der Wirtszelle (Alkhatib et al. 1990). Das F-Protein ist ein Typ-I-Transmembrannglykoprotein und wird als Homotrimer oder Homotetramer auf der Virusoberfläche exprimiert (Malvoisin & Wild et al. 1993). Es wird als inaktives Vorläuferprotein F₀ (60 kDa) im ER synthetisiert und glykosyliert. Im Golgi-Apparat wird es dann durch eine Endoprotease (Furin) in zwei Untereinheiten F1 (40 kDa) und F2 (20 kDa) gespalten, die über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben (Sato et al. 1988). Das aminoternale Ende des F1-Proteins enthält ein hydrophobe, hoch konservierte Region, das fusionsaktive Peptid (Richardson et al. 1986). Die F2 Untereinheit enthält drei N-Glykosylierungsstellen, die für die Reifung, Spaltung und Funktion des F-Proteins erforderlich sind (Hu et al. 1995).

Das **Largeprotein** (L, 180 kDa) ist die katalytisch aktive RNA-abhängige RNA-Polymerase, die aber nur im Komplex mit P- und N-Proteinen wirken kann. Das L-Protein ist neben der Transkription und Replikation auch für die „Capping“- und Methylierungsreaktionen der 5' Enden sowie die 3' Polyadenylierung der RNA-Transkripte zuständig (Horikami et al. 1995).

1.2.4 Genomaufbau und Replikation

Das einzel- und negativsträngige RNA-Genom des MV ist nicht segmentiert und hat eine Länge von ungefähr 16 kb. Das Genom ist am 3' („Leader“) und am 5' („Trailer“) Ende von nicht-kodierenden Sequenzen flankiert, in der die Promotorregionen für die Transkription und Replikation lokalisiert sind. Die Leadersequenz dient zur Anlagerung des

Polymerasekomplexes und damit zur Initiation der Transkription des N-Gens. Zwischen den proteinkodierenden Sequenzen befinden sich jeweils kurze intergenische Sequenzen (intergenic sequences), die nicht für Proteine kodieren. Diese können sowohl zur Beendigung der Transkription genutzt werden, als auch zur Synthese bi- oder polyzistronischer Transkripte überlesen werden. Beim Erreichen der intergenischen Sequenz zwischen dem N- und dem P-Gen kommt es in der Regel zum Abbruch der Transkription. Das gebildete Transkript enthält eine Capstruktur und wird polyadenyliert. An der nächsten Initiationssequenz innerhalb der intergenischen Sequenz des P-Gens wird die Transkription erneut gestartet. Ähnliche Sequenzen befinden sich ebenso vor dem M-, F-, H- und dem L-Gen. Beim Überspringen der intergenischen Sequenzen kann es jedoch zum Abfallen des Polymerasekomplexes kommen. Dadurch entsteht ein Transkriptionsgradient von 3' nach 5', welcher nach der Translation für große Mengen an N-Protein, aber nur wenig L-Protein sorgt (Cattaneo et al. 1987, Schneider-Schaulies et al. 1990).

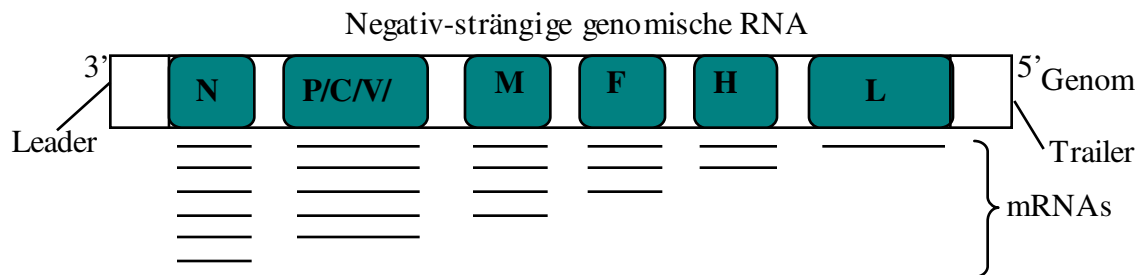


Abb. 1.2: Schematische Darstellung des MV-Genoms mit Transkriptionsgradient

Für das Umschalten von Transkription auf die Replikation des Genoms bzw. zur Bildung von Antigenomen mit positiver Orientierung ist eine ausreichende Menge des N-Proteins im Zytoplasma notwendig. Die Polymerase ignoriert dann die Stopsequenzen in den intergenischen Sequenzen und es wird ein vollständiger Positivstrang synthetisiert. Die gebildeten Positivstränge werden als Matrizen zur Bildung neuer negativsträngiger RNA-Genom benutzt.

Zur Freisetzung neuer Viruspartikel lagern sich die M-Proteine an die Innenseite der Zytoplasmamembran an und wechselwirken mit den dort lokalisierten F- und H-Proteinen. Diese interagieren dann mit dem RNP-Komplex. Die Viruspartikel werden durch Budding oder Lyse der Zelle freigesetzt (Manie et al. 2000).

1.2.5 Zelluläre Rezeptoren für MV

Der erste Schritt des Infektionszyklus ist die Adsorption des Virus an die Wirtszelle. Als zellulärer Rezeptor des MV wurden zwei Oberflächenmoleküle identifiziert: Das „membrane cofactor protein“ MCP oder CD46 und das „signaling lymphocytic activation molecule“ SLAM oder CD150.

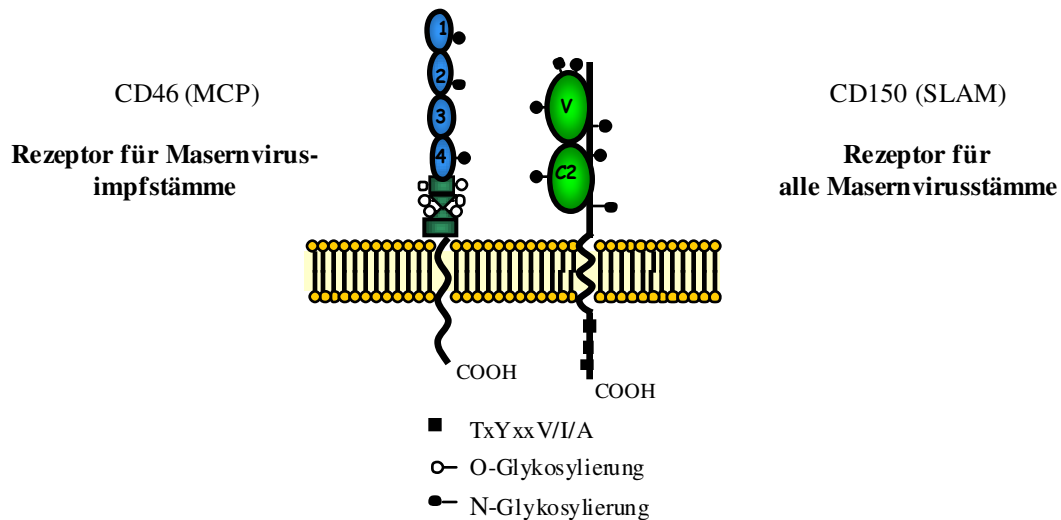


Abbildung 1.3: Die zellulären Rezeptoren CD46 und CD150 des Masernvirus

CD46 wird ubiquitär auf allen humanen Zellen außer Erythrozyten (Cole et al. 1985) und auch wenig im ZNS exprimiert (Ogata et al. 1997). Es gehört zu der Familie der Komplementrezeptoren und bindet an die Faktoren C3b und C4b des Komplements, um so körpereigene Zellen vor der Lyse durch die autologe Komplementaktivierung zu schützen. CD46 stellt nicht nur einen Komplementinhibitor dar, sondern ist auch an der Fertilisation beteiligt. In den humanen Spermatozoen findet die CD46 Expression auf der inneren akrosomalen Membran statt, welche nach der Bindung der männlichen Keimzelle an die Zona pellucida der weiblichen Eizelle freigesetzt wird (Riley-Vargas et al. 2004).

Eine Defizienz an CD46 äußert sich im hämolytisch urämisches Syndrom (HUS). Bei dieser Erkrankung kann es zu schwerwiegenden Schädigungen der Blutgefäße, Blutzellen und der Niere kommen (Goodship et al. 2004).

1993 wurde CD46 dann als Rezeptor für attenuierte Masernvirusimpfstämme identifiziert (Dörig et al. 1993, Naniche et al. 1993, Manchester et al. 2000a).

CD46 wird durch alternatives Spleißen hauptsächlich in vier Isoformen exprimiert. Mit CHO-Zellen, jeweils nur eine Isoform C1, C2, BC1 oder BC2 exprimierend, konnte bewiesen werden, dass alle vier Isoformen von CD46 als Rezeptormolekül für das MV dienen (Manchester et al. 1994, Gerlier et al. 1994), wobei die Bindung des Hämagglutininproteins an die beiden äußeren SCR-Domänen 1 und 2 ausreichend ist (Manchester et al. 1995, Buchholz et al. 1997). Um besser verstehen zu können, wie CD46 mit dem Masernvirus interagiert, wurden mittels Austauschmutagenese, blockierenden Antikörpern und kristallographischen Analysen die Struktur der MV-Bindungsstelle in den beiden SCR-Domänen näher untersucht. Dabei fand man heraus, dass die Aminosäuren Glu24, Arg25, Prolin39 und Asp70 beteiligt sind an der Bindung mit dem MV-H-Protein (Mumenthaler et al. 1997, Casanovas et al. 1999, Manchester et al. 2000b).

Anschließend wird CD46 in Abhängigkeit von dem MV-Stamm von der Zelloberfläche herunterreguliert. Diese Fähigkeit der Herabregulierung von CD46 beruht auf wenigen Aminosäuren in der Sequenz des Hämagglutininproteins (Schneider-Schaulies et al. 1995 a, Schneider-Schaulies et al. 1995b, Bartz et al. 1996, Lecouturier et al. 1996).

Veröffentlichungen aus den Jahren 1997/1998 gaben Hinweise darauf, dass es noch einen anderen Rezeptor außer CD46 für Wild-Typ-MV wie z. B. WTF geben muss (Tanaka et al. 1997, Bartz et al. 1998, Hsu et al. 1998). Es wurde gezeigt, dass z. B. die Infektion von BJAB-Zellen mit WTF nicht mit blockierenden Antikörpern gegen CD46 inhibiert werden konnte. Desweiteren verursachte die Infektion mit WTF keine CD46 Downregulation im Vergleich zu einer Edm-Infektion. BJAB-Zellen konnten besser mit WTF infiziert werden als HeLa-Zellen, die eine stärkere CD46 Expression besitzen. Dies bedeutet, dass die Bindungsfähigkeit von WTF nicht abhängig von der Stärke der CD46 Expression war. (Bartz et al. 1998).

Im Jahre 2000 wurde CD150 oder auch *signaling lymphocytic activation molecule (SLAM)* genannt, als Rezeptor für Impfstämme- und Wildtypviren identifiziert (Tatsuo et al. 2000, Erlenhoefler et al. 2001, Erlenhoefler et al. 2002). Desweiteren wirkt SLAM als stimulatorisches Molekül für die T-Zell Aktivierung (Cocks et al. 1995). Das glykosylierte Transmembranoberflächenprotein gehört als kostimulatorisches Molekül zur CD2 Untergruppe der Immunglobulin-Superfamilie (Veillette und Latour et al. 2003, Sidorenko et

al. 2003). Das humane SLAM wird an der Zelloberfläche von unreifen Thymocyten, T-Gedächtniszellen und aktivierten B- und T-Zellen exprimiert (Aversa G et al. 1997, Cocks et al. 1995, Siderenko et al. 2003, Tatsuo et al. 2000).

Durch Behandlung der T-Zellen (CD4 positiv) mit Interleukin-12 konnte man eine erhöhte Expression von SLAM nachweisen, wobei diese Expression auf T-Helfer-1-Zellen um ein Vielfaches höher war als auf T-Helfer-2-Zellen (Hamalainen et al. 2000).

Frisch aus PBMCs isolierte Monozyten exprimieren kein SLAM auf der Zelloberfläche. Eine deutliche Expression von SLAM zeigte sich jedoch nach Stimulierung mit PHA, LPS oder dem Masernvirus. Es zeigte sich, dass durch Blockierung des SLAM Rezeptors die Infektion mit Wild-Typ-MV inhibiert werden konnte. Dies beweist, dass SLAM auch auf Monozyten als MV-Rezeptor fungiert (Minagawa et al. 2001).

1.3 Das vaskuläre Endothel

1.3.1 Funktionen des Endothels

Endothelzellen sind die Zellen, die Blutgefäße auskleiden bzw. ausbilden. Die wichtigsten Komponenten der Gefäßwände sind das Endothel, die glatte Muskulatur und die Extrazellulärmatrix. Als Endothel (lat: endothelium) bezeichnet man die zum Gefäßlumen hin gerichteten Zellen der innersten Wandschicht von Lymph- und Blutgefäßen. Die glatte Muskulatur ist für die Einstellung der Wandspannung und der Gefäßweite verantwortlich und produziert die Extrazellulärmatrix, die aus Kollagenen und elastischen Fasern besteht. Die Funktionen des Endothels sind vielfältig. Sie spielen eine zentrale Rolle bei der Regulation der Gefäßweite durch Sezernierung von gefäßerweiternden, z. B. Stickstoffmonoxid, und gefäßverengenden Stoffen, z. B. das Peptid Endothelin. Das Endothel hat aufgrund von Sekretion, Bindung, Aktivierung oder Inaktivierung von Gerinnungsfaktoren Anteil an den Mechanismen, die die Bildung von Blutgerinnseln normalerweise verhindern oder nach Gefäßverletzung fördern. Dazu gehören u. a. die Sekretion des von Willebrand-Faktors, der in endothelspezifischen Organellen (Weibel-Palade-Granula) gespeichert wird. Desweiteren stellt das Endothel eine Diffusionsbarriere dar. Die Zellen sind durch „tight

junctions“ miteinander verbunden, die den passiven Durchtritt von makromolekularen Plasmabestandteilen in die subendotheliale Schicht verhindern. Das Endothel interagiert mit den Zellen des Immunsystems über eine Reihe von Zytokinen und vermittelt die *Migration von Leukozyten* durch die Expression von Zelladhäsionsmolekülen.

1.3.2 Leukozytenmigration

Die Auswanderung von Leukozyten aus den Blutgefäßen in das Gewebe spielt eine entscheidende Rolle bei der Bekämpfung von Krankheitskeimen, die ins Gewebe eingedrungen sind, sowie bei der Wundheilung und Gewebeerneuerung. Durch eine vorübergehende Bindung der verschiedenen Leukozyten an die Gefäßwände werden die ersten Voraussetzungen zur Emigration ins Gewebe geschaffen. Die molekularen Mechanismen, welche diesen und die folgenden dynamischen Vorgänge der Leukozytenmigration regulieren, erfolgen in fünf Schritten: die *Anhaftung*, das *Rollen*, die *Aktivierung*, die *feste Adhäsion* und die *Transmigration*.

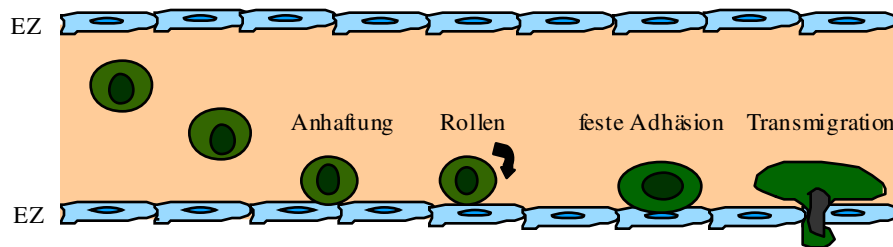


Abbildung 1.4: Die einzelnen Schritte der Leukozytenmigration

Der erste Kontakt zwischen Leukozyten und Endothelzellen wird durch sog. Adhäsionsmoleküle hergestellt. Durch die Scherkräfte des Blutflusses kommt es zur De-Adhäsion und es bildet sich am anderen Ende der zwischen Leukozyten und Endothelzellen gelegenen Kontaktfläche eine erneute Interaktion. Diesen Vorgang des Wechsels von Adhäsion und De-Adhäsion bezeichnet man als *Rollen* (die Leukozyten rollen über die

Oberfläche der Endothelzellen). Bei diesem Vorgang sind die **Selektine (CD62)** von Bedeutung. Dabei handelt es sich um lang gestreckte, membrangebundene Glykoproteine, die sich durch eine NH₂-terminale Lektindomäne, eine dem epidermalen Wachstumsfaktor entsprechende Domäne, sowie durch repetitive Strukturen, die komplementregulierenden Proteinen ähneln, auszeichnen. Sie werden entsprechend ihrer Herkunft in E-Selektin (Endothelzellen), L-Selektin (Leukozyten) und P-Selektin (Plättchen und Endothelzellen) eingeteilt. Mit den **Integrinen** gehen sie eine noch festere Bindung ein, man spricht dann von einer *Adhäsion*. Hierzu müssen die Leukozyten aber erst durch Chemokine aktiviert werden, z. B. durch das Interleukin-8, das über die Proteoglykane des Endothels exprimiert wird. Das führt dazu, dass eine weitere Familie der Adhäsionsmoleküle, z. B. die Integrine LFA-1 (CD11a/ CD18) und VLA-4 (CD49b/CD29), von einer inaktiven zu einer aktiven Konformation überführt wird. Die Integrine sind heterodimere Moleküle, die aus einer α - und einer β -Kette bestehen und über nicht-kovalente Interaktionen verbunden sind. Das aktivierte Integrin ist nun in der Lage, die für sie spezifischen Liganden auf der Oberfläche von Endothelzellen zu binden. Diese Adhäsionsmoleküle gehören zu der Immunglobulinsuperfamilie wie z. B. **ICAM** (Interzelluläres Adhäsionsmolekül), **VCAM** (Vaskuläres Adhäsionsmolekül) und **PECAM** (Plättchen-endotheliales Adhäsionsmolekül). Alle werden vom Gefäßendothel exprimiert und können durch verschiedene Zytokine wie z. B. LPS, TNF- α , IL-4 und IFN- γ induziert werden (Stins et al. 1997). In Experimenten mit humanen Nabelschnurendothelzellen (Human umbilical vein endothelial cells, HUVECs) konnte gezeigt werden, dass bei einmaliger Stimulation die Expression von VCAM nach sechs Stunden ein Maximum erreicht (Swerlick et al. 1992). Bei der Adhäsion des Leukozyten bindet das Integrin LFA-1 an ICAM und VLA-4 an VCAM.

Für eine koordinierte *Transmigration* von Leukozyten ist die molekulare Anordnung im Zytoskelett entscheidend. Aktivierte Leukozyten verändern ihre Morphologie, wobei sie eine kegel- oder spindelähnliche Form annehmen. Die Zellbewegung erfolgt dann über Aktin-Moesin vermittelte, ATP abhängige Prozesse. Die Aktinpolymerisation in der als Pseudopodium bezeichneten schmalen Struktur bewirkt eine Vorwärtsbewegung der Zelle. Der restliche Zellkörper mit seinen als Uropodien bezeichneten Fortsätzen wird nachgezogen. Entlang eines IL-8 Gradienten finden die Leukozyten dann ihren Weg zu der Stelle der Entzündung.

1.3.3 Spezifische Endothelzellmarker

Das Lektin *Ulex-europaeus-Agglutinin I* ist ein wichtiger Marker für die Charakterisierung von Endothelzellen. Lektine sind Proteine, die terminale Zuckerreste von Glykokonjugaten an Zellmembranen binden. Aufgrund ihrer Struktur können Lektine, ähnlich einer Antigen-Antikörper Reaktion, Zellen agglutinieren oder Präzipitate mit Glykokonjugaten bilden. Ein spezifischer Marker für humane Endothelzellen ist das *Ulex-europaeus-Agglutinin I* (UEA I) (Holthöfer et al. 1982). Dieses Lektin wird aus *Ulex-europaeus* (Stechginster) Samen isoliert. Ein weiteres endothelspezifisches Markerprotein ist der *von-Willebrand-Faktor*. Man findet es als zirkulierendes Plasmaprotein in Assoziation mit dem Faktor VIII (Hannah et al. 2002). Bei Mangel oder Vorliegen eines abnormen vWF kommt es zur Störung der Blutgerinnung (Nichols & Ginsburg et al. 1997). VWF wird von Endothelzellen und Megakaryozyten exprimiert. Die Endothelzellen sezernieren einen großen Teil davon ins Blut, wo es an Faktor VIII bindet. Gespeichert wird es in sekretorischen Organellen, den Weibel-Palade-Körperchen (Hannah et al. 2002).

1.3.4 Blut-Hirn-Schranke

Eine besondere Stellung bei vaskulären Endothelzellen nimmt die Blut-Hirn-Schranke ein, die eine physiologische Barriere zwischen dem Zentralnervensystem und dem Blutkreislauf darstellt. Durch den speziellen Aufbau der Gefäßwand der Blutgefäße im Gehirn können fast keine polaren Substanzen durch die Zellzwischenräume auf dem Weg des parazellulären Transports aus dem Blut in das Hirngewebe eindringen. Dies dient dem Schutz des Gehirns vor den im Blut zirkulierenden Krankheitserregern und Toxinen. Die Blut-Hirn-Schranke kann bei Entzündungen, Durchblutungsstörungen oder verschiedenen Erkrankungen gestört oder geschädigt werden.

1.4 Ziele dieser Arbeit

Bei der hämatogenen systemischen Ausbreitung des Virus sind Endothelzellen eine Barriere zu den Organen. Wird diese Barriere überwunden, kann es nach Infektion von Endothelzellen, Leukozyten und Zellen des dahinterliegenden Gewebes zum charakteristischen Exanthem auf der Haut kommen. In letalen Fällen der akuten Masemenzephalitis wurden zwar infizierte Endothelzellen im Gehirn, jedoch keine infizierten neuronalen Zellen gefunden. Die Infektion der Endothelzellen könnte ursächlich mit der Erkrankung zusammenhängen. Bei der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE) könnte der Transport des Virus in das zentrale Nervensystem (ZNS) über Infektion von Endothelzellen zur Entstehung der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE) führen. In den Gehirnen dieser Patienten wurden post mortem neben MV-infizierten Neuronen und Gliazellen auch MV-infizierte Endothelzellen gefunden (Allen et al. 1996, Isaacson et al. 1996, Kirk et al. 1991).

Um einen Einblick in die zugrundeliegenden Mechanismen zu bekommen, wurden folgende Aspekte untersucht:

- 1) Untersuchung der gerichteten Expression viraler Hüllproteine und der Virusfreisetzung in polarisierten EZ. Hier stand ein rekombinantes MV mit veränderten zytoplasmatischen Domänen der Hüllproteine zur Verfügung, die in polarisierten Epithelzellen unterschiedlich transportiert werden (Moll et al. 2001).
- 2) Untersuchung des Effektes der MV-Infektion auf die Transmigration aktivierter Leukozyten.
- 3) Analyse des Einflusses der MV-Infektion auf die Expression und Aktivierung der Integrine LFA-1 und VLA-4.
- 4) Analyse des Adhäsionsverhaltens von infizierten Leukozyten an Endothelzellen.
- 5) Untersuchung des Einflusses der MV-Infektion auf die Ausbildung einer docking-Struktur (Barreiro et al. 2002, Carman et al. 2004) zwischen Leukozyt und Endothelzelle.
- 6) Untersuchung der Virusausbreitung in infizierten Endothelzellschichten.

2 Material

2.1 Zellen

In der Endothelzelloforschung dienen die Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnur, *human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC), als *in-vitro* Modell für die zellbiologische Funktionalität vaskulärer Endothelzellen. Hierbei handelt es sich um frisch isolierte, primäre Zellen. Die für die Isolierung der Endothelzellen erforderlichen Nabelschnüre wurden mit Genehmigung und freundlicher Unterstützung des Kreißsaalteams von der Universitätsfrauenklinik Würzburg erhalten.

Die HBMECs, eine humane, mit dem SV40-Large-T-Antigen transfizierte und immortalisierte, mikrovaskuläre Hirnendothelzelllinie (*human brain microvascular endothelial cells*), war eine freundliche Gabe von Herrn Prof. Kwang Sik Kim, M. D., von der Abteilung für pädiatrische Infektiologie des Fachbereichs Pädiatrie der Johns-Hopkins-Universität in Baltimore, Maryland, USA.

In dieser Arbeit wurden die Endothelzellen auf Transwell Filtern ausgesät und für die transendotheliale Leukozytentransmigration eingesetzt.

Die anderen Zelllinien waren alle am Institut für Virologie und Immunbiologie vorhanden.

Tabelle 2.1. zeigt eine Übersicht über die Zellarten und deren Herkunftsspezies.

BEZEICHNUNG	ZELLTYP	SPEZIES	HERKUNFT/ LITERATUR
Eahy926	Entstammt aus der Fusion von HUVEC und der entarteten Epithelzelllinie 594	Mensch (Homo sapiens sapiens)	Edgell et al. 1983
HBMEC	mikrovaskuläre, SV40-Large-T-Antigen-transformierte Hirnendothelzellen	Mensch (Homo sapiens sapiens)	Kwan Sik Kim Johns Hopkins University Baltimore, USA

HUVEC	primäre Endothelzellen aus der Nabelschnurvene	Mensch (Homo sapiens sapiens)	Universitäts- frauenklinik, Würzburg, Marin et al. 2001
PBMC	(engl.) peripheral blood mononuclear cells, z. B. Monozyten, T-Zellen, B-Zellen	Mensch (Homo sapiens sapiens)	Transfusions- medizin, Universität Würzburg
Vero	Epithelzellen der Niere, Fibroblasten-Zelllinie	Afrikanische Grüne Meerkatze	Yasumura et al. 1963
Vero- hSLAM	SLAM-transfizierte und -exprimierende Nierenepithelzellen	Afrikanische Grüne Meerkatze (Chlorocebus aethiops)	Yusuke Yanagi, Faculty of Medicine, Fukuoka, Japan, Tatsuo et al. 2000

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

2.2 Viren

KURZBEZEICHNUNG	STAMM	JAHR	ZELLINIE FÜR PASSAGIERUNG	HERKUNFT
MV _{Edm}	Edmonston B Vaccine/60s	1954	Vero	Prof. ter Meulen, Institut für Virologie, Würzburg
RMV _{FHY/A}	Rekombinantes Edmonston	2001	Vero	Andrea Maisner, Institut für Virologie, Marburg

rMV _{IC323eGFP}	Recombinantes Wildtypvirus	2002	Vero-hSLAM	Yusuke Yanagi, Faculty of Medicine, Fukuoka, Japan
--------------------------	-------------------------------	------	------------	--

Tabelle 2.2: Übersicht über die verwendeten Masernvirusstämme

Die Tabelle zeigt Vakzin (Edmonston-) MV, recombinante Edm- und Wildtyp (rMV_{IC323eGFP})-Masernvirusstämme sowie das Jahr der Isolation, die verwendete Zelllinie zur Passagierung und die Herkunft.

2.3 Antikörper

2.3.1 Monoklonale Primärantikörper

KLON	ZIELMOLEKÜL	ZIELSPEZIES	ISOTYP	KONJUGAT	HERSTELLER
---	Aktin	Wide rang	IgG ₁	---	Sigma (Kat.-Nr. A2066)
HIT3a	CD3	Mensch	---	FITC	Becton Dickinson (Kat.-Nr. 555339)
UCHT1	CD3	Mensch	---	PE	Becton Dickinson (Kat.-Nr. 555333)
FN50	CD69	Mensch	---	PE	Becton Dickinson (Kat.-Nr. 55531)
G46-6	HLA-DR	Mensch	---	PE	Becton Dickinson (Kat.-Nr. 555812)
A12	CD150	Mensch	IgG ₁	FITC	AbD Serotec (Kat.-Nr. MCA 225 1F)

53504	CCR1 (CD191)	Mensch	IgG _{2b}	Alexa Fluor®647	Becton Dickinson (Kat.-Nr. 557914)
48607	CCR2 (CD192)	Mensch	IgG _{2b}	Alexa Fluor®647	Becton Dickinson (Kat.-Nr. 558406)
3A9	CCR1 (CD195)	Mensch	IgG _{2a}	APC	Becton Dickinson (Kat.-Nr. 550856)
HUTS-4	Integrin β1, aktiviert (CD29)	Mensch	IgG _{2b}	---	Chemicon (Kat.-Nr. MAB 2079Z)
4B7R	Integrin β1 (CD29)	Mensch	IgG ₁	Alexa Fluor®647	AbD Serotec (Kat.-Nr. MCA 1949A647)
P4C10	Integrin β1 (CD29), inhibierend	Mensch	IgG ₁	---	Chemicon (Kat.-Nr. MAB 1987)
MEM48	Integrin β2 (CD18)	Mensch	IgG ₁	---	Chemicon (Kat.-Nr. CBL158)
NKI-L 16	αL- Integrin, aktiviert (CD18)	Mensch	IgG ₁	---	T. Geijtenbeek, Amsterdam
G43-25B	αL- Integrin, nicht-aktiviert (CD11 a)	Mensch	IgG _{2a}	---	Becton Dickinson (Kat.-Nr. 555378)
A504	F	MV	IgG ₁	---	S. Löffler, Institut für Virologie, Würzburg
CV8	M	MV	IgG ₁	---	Chemicon (Kat.-Nr. MAB 8910)
F227	N	MV	IgG ₃	---	S. Löffler, Institut für Virologie, Würzburg

K83	H	MV	IgG _{2a}	---	S. Löffler, Institut für Virologie, Würzburg
K4	H	MV	IgG _{2a}	---	S. Löffler, Institut für Virologie, Würzburg
8.4A6	ICAM (CD54)	Mensch	IgG ₁	---	Invitrogen (Kat.-Nr. AHS5428)
1304	ICAM (CD54)-	Mensch	IgG _{2a}	Biotin	Acris (Kat.-Nr. BM 4050B)
P2A4	ICAM (CD54), inhibierend	Mensch	IgG ₁		Chemicon (Kat.-Nr. 2146Z)
P3C4	VCAM (CD106)	Mensch	IgG ₁	---	Chemicon (Kat.-Nr. MAB2144)
STA	VCAM (CD106),	Mensch	IgG ₁	Biotin	eBioscience (Kat.-Nr. 13-1069)
1.G11B1	VCAM (CD106), inhibierend	Mensch	IgG ₁	---	Chemicon (Kat.-Nr. CBL206)
2F2-A9	vWF	Mensch	IgG ₁	---	antikörper-online (Kat.-Nr. ABIN133443)
ZO1- 1A12	ZO-1	Mensch	IgG ₁	---	Zytomed Systems (Kat.-Nr. 126-0007)
1A12	ZO-1	Mensch	IgG ₁	FITC	Zytomed Systems (Kat.-Nr. 33-9111)

Tabelle 2.3: Übersicht über die verwendeten monoklonalen Primärantikörper.

2.3.2 Sekundärantikörper

ZIELMOLEKÜL	ZIELSPEZIES	HERKUNFT	ISOTYP	KONJUGAT	HERSTELLER
IgG (H+L)	Maus	Ziege	IgG	Alexa Fluor® 488	Invitrogen (Kat.-Nr. A11005)
IgG (H+L)	Maus	Ziege	IgG	Alexa Fluor® 594	Invitrogen (Kat.-Nr. A11001)
IgG (H+L)	Maus	Ziege	IgG	Alexa Fluor® 633	Invitrogen (Kat.-Nr. A21050)
IgG (H+L)	Kaninchen	Ziege	IgG	HRPO	Dianova (Kat.-Nr. 75883)
IgG (H+L)	Maus	Ziege	IgG	HRPO	Dianova (Kat.-Nr. 76652)
IgG (H+L)	Maus	Ziege	IgG	APC	Becton Dickinson (Kat.-Nr. 550826)

Tabelle 2.4: Übersicht über die verwendeten konjugierten, polyklonalen Sekundärantikörper

Für die Detektierung der biotinylierten Proteine wurde als Sekundärsubstanz das Streptavidin HRPO von Chemicon (Kat.-Nr. 18-152) verwendet.

2.3.3 Antikörsersen

Kaninchen-Anti-Masemvirus-Hämagglutininprotein-Antikörper H45

Sibylle Schneider-Schaulies, Institut für Virologie, Würzburg

Kaninchen-Anti-Masernvirus-Fusionsprotein-Antikörper F42

Sibylle Schneider-Schaulies, Institut für Virologie, Würzburg

2.4 Zytokine, Mediatoren

Als Stimulantien sind folgende Zytokine verwendet worden:

Phytohemagglutinin-L (Kat.-Nr. 11249738001)

Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Deutschland

Rekombinant, humanes RANTES (Kat.-Nr. C 64130)

Promokine, Heidelberg, Deutschland

Rekombinant, humanes MCP-1 (Kat.-Nr. C-64030)

Promokine, Heidelberg, Deutschland

Rekombinanter, humaner Tumor-Nekrose-Faktor- α (Kat.-Nr. 120304)

Strathmann Biotech GmbH, Hannover, Deutschland

2.5 Nachweis des endothelspezif. Markers *Ulex-europaeus*-Agglutinin I

Zum endothelzellspezifischen Nachweis von *Ulex-europaeus*-Agglutinin I wurde das Biotin-Streptavidin-System bei der Immunfluoreszenzmikroskopie eingesetzt. Das biotinylierte *Ulex-europaeus*-Agglutinin I wurde vom fluoreszenzfarbstoffgekoppelten Streptavidin detektiert. Die Zellkerne wurden mit dem DNA-interkalierenden Farbstoff DAPI angefärbt. Folgende Stoffe fanden Verwendung:

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

Vector Laboratories, Burlingame, Kalifornien, Vereinigte Staaten von Amerika

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

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

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

Molecular Probes, Leiden, Niederlande

2.6 Enzyme

Für die Ablösung adhärenter Zellen wurde die Lösung ATV verwendet.

ATV-Lösung

(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

Zur Isolation der Endothelzellen aus der Vene einer menschlichen Nabelschnur wurde das Enzym Collagenase benutzt.

Collagenase A (Kat.-Nr. 103 586)

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

2.7 Nährmedien und Seren

Als Nährmedien und Seren wurden die folgenden Substanzen und Produkte verwendet:

FKS (Kat.-Nr. S0115)

Biochrom, Berlin, Deutschland

Endothelial Cell Growth Medium 2 für HUVECs:

(2 % (v/v) FKS, 5,0 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor, 0,2µg/ml Hydrocortison, 0,5 ng/ml endothel-vaskulärer Wachstumsfaktor, 10,0 ng/ml Fibroblasten-Wachstumsfaktor, 20,0 ng/ml long R3 IGF-1, 1 µg/ml Ascorbinsäure, 22,5 µg/ml Heparin, 0,63 ng/ml Phenol Rot) (Kat. Nr. C-22011)

Promocell, Heidelberg, Deutschland

Endothelial cell Growth Medium MV für HBMEC:

(5 % (v/v) FKS, 0,4 % (v/v) endothelialer Wachstumsfaktor, 10,0 ng/ml epidermaler Wachstumsfaktor, 1 µg Hydrocortison, 0,62 ng/ml Phenol Rot) (Kat.-Nr. C-22020)

Promocell, Heidelberg, Deutschland

MEM Minimal essential medium

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

Natriumhydrogencarbonat 5,6 % (w/v)

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

Overlay-Agar

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

Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg, Deutschland

RPMI 1640 mit 25 mM HEPES und GlutaMAX™ I (Kat.-Nr. 72400-054)

Gibco, Karlsruhe, Deutschland

2.8 Lösungen und Puffer

Als Lösungen und Puffer fanden die folgenden Substanzen und Produkte Verwendung.

Selbst erstellte Lösungen oder Puffer sind ohne Herstellerangaben aufgelistet:

Blockierpuffer

(10 % (w/v) Magermilchpulver in PBS)

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⁽⁻⁾)

HEPES (Art.-Nr. 9105.3)

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Lämmli-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 Detergenz, 125 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM EDTA sowie 1 Tablette Proteaseinhibitor pro 50 ml Endvolumen ad Aqua dest. und pH 7,4)

Octadecyl Rhodamin B Chlorid (R18)

10 mM in DMSO

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

P-Puffer

(10mM Glukose, 1 mM Natriumpyruvat, 10 mM Hepes, 3mM Calciumchlorid, 145 mM Natriumchlorid ad 50 ml Aqua dest.)

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 x 2 H₂O, 0,2 g/l KH₂PO₄, 0,167 g/l CaCl₂ x 4 H₂O und 0,1 g/l MgCl₂ x 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 x 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.)

RIPA-Puffer

(0,15 m NaCl, 10 mM Tris, pH 7,4)

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) (Kat.-Nr. T-8154)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Versene-Lösung

0,02 % (w/v) KCl, 0,02 % (w/v) KH_2PO_4 , 0,06 % (w/v) K_2HPO_4 , 0,82 % (w/v) NaCl,
0,02 % (w/v) Versene ad Aqua bidest.

Westem-Blot-Puffer-Anode I

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

Westem-Blot-Puffer-Anode II

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

Westem-Blot-Puffer-Kathode III

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

2.9 Chemikalien und Antibiotika

Folgende Chemikalien und Antibiotika wurden eingesetzt:

Acrylamid 4K-Lösung 30 %, Mix 37,5:1 (Kat.-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 (Kat.-Nr. 15510-027)

Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Aminocapronsäure (Kat.-Nr. S-2504)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Ammoniumpersulfat (Kat.-Nr. A-3678)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Bacto™ Agar (Kat.-Nr. 214010)

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Bicinchoninsäurelösung (Kat.-Nr. B-9643)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

β-Mercaptoethanol (Kat.-Nr. M-7154)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Bromphenolblau (Kat.-Nr. A3640)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

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

MP Biomedicals, Illkirch, Frankreich

BSA Standard zur Protein Bestimmung 2 % (w/v) BSA

Interchim, Montlucon, Frankreich

1-Butanol (Kat.-Nr. A3066)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

DABCO (Kat.-Nr. D-2522)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Dimethylsulfoxid (Kat.-Nr. A994.1)

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

EDTA (Kat.-Nr. E-6758)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Essigsäure (Kat.-Nr. A0820)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Entwicklungs- und Fixierlösung

Kodak, Stuttgart, Deutschland

Ethanol absolut (Kat.-Nr. A3693)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

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

Gelatine, Typ A, aus Schweinehaut (Kat.-Nr. G-2500)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

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

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Glycerin (Kat.-Nr. 00749)

Ferak Laborat, Berlin, Deutschland

Glycin (Kat.-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) (Kat.-Nr. B-2284)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Magermilchpulver (Kat.-Nr. 70166)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Methanol (Kat.-Nr. 106009)

Merck, Darmstadt, Deutschland

MOWIOL[®] 4.88 (Kat.-Nr. 475904)

Calbiochem, Nottingham, England

Natriumazid (Kat.-Nr. S-2002)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Natriumchlorid (Kat.-Nr. A2942)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

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

Calbiochem, Nottingham, England

„Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets” (Kat.-Nr. 1177500)

Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland

Paraformaldehyd (Kat.-Nr. A3813)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Protein-G-SepharoseTM 4 Fast Flow Beads (Kat.-Nr. 17-0618-01)

Amersham Biosciences, Uppsia, Schweden

Proteinstandard Prestained Protein Ladder (Kat.-Nr. SM0671)

Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland

Proteinstandarlösung 1,0 mg/ml (Kat.-Nr. P-0914)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Natriumdodecylsulfat (Kat.-Nr. A1502)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

TEMED (Kat.-Nr. T-9281)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

Tris (Kat.-Nr. A1086)

AppliChem, Darmstadt, Deutschland

Triton X-100 (Kat.-Nr. 023K0007)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

TWEEN[®] 20 (Kat.-Nr. P-1379)

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

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

Sigma, Taufkirchen, Deutschland

2.10 Ein- und Mehrwegmaterialien

Steriles Einwegmaterial für Experimente in den Bereichen Zellkultur, Proteinbiochemie und Molekularbiologie sowie für die allgemeine Laborarbeit wurde von den Firmen Eppendorf, Greiner, Nalge Nunc und Sarstedt geliefert. Sehr häufig verwendete oder spezielle Materialien sind nachstehend aufgelistet.

Deckgläser

Superior Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland

Dialyseschläuche Typ 27/32

Serva, Heidelberg, Deutschland

Durchflusszytometrieröhrchen (Kat.-Nr. RE03)

Hartenstein, Würzburg, Deutschland

Einmalhandschuhe

Carl Roth, Karlsruhe, Deutschland

Braun, Melsungen, Deutschland

Einmalskapelle

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 (Kat.-Nr. 177429), 4 (Kat.-Nr. 177437) oder 8 Kammern (Kat.-Nr. 177445)

Nalge Nunc, Wiesbaden, Deutschland

Kryokonservierungsröhrchen (Kat.-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

Transwell-Filter- Einsätze 8 µm Porengröße für 6-well Platten (Kat.-Nr. 353093)

Transwell-Filter- Einsätze 0,4 µm Porengröße für 6-well Platten (Kat.-Nr. 353493)

Falcon[®], Schubert & Weiss, München, 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 (Kat.-Nr. 013151)

Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland

Zellkulturflaschen Cellstar™ mit Filter

Größen 25 cm² oder 50 ml (Kat.-Nr. 690 175), 75 cm² oder 250 ml (Kat.-Nr. 668 175),
175 cm² oder 550 ml (Kat.-Nr. 660 175) oder 175 cm² oder 650 ml (Kat.-Nr. 661 175)

Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

Zellkulturflaschen Cellstar™ ohne Filter

Größen 25 cm² oder 50 ml (Kat.-Nr. 690 170), 75 cm² oder 250 ml (Kat.-Nr. 658 170),
175 cm² oder 550 ml (Kat.-Nr. 660 160) oder 175 cm² oder 650 ml (Kat.-Nr. 661 160)

Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

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

Zellkulturplatten 12 Wells (Kat.-Nr. 665 180)

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

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

Zellkulturplatten 96 Wells, schwarz mit transparentem Boden (Kat.-Nr. 655090)

Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

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

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

Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland

2.11 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.

Analysenwaage

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 FACScan™ mit Software Lysis II™ und CellQuest™

Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland

Eismaschine AF30

Scotsman, Mailand, Italien

Filterapparatur

Fluoreszenzmikroskop Aristoplan

Fluoreszenzreader Safire 2

Tecan, Crailsheim, Deutschland

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

Wippschüttler

Edmund Bühler, Tübingen, 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 $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$

Revco, Asheville, North Carolina, Vereinigte Staaten von Amerika

Tiefkühlschrank $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$

Siemens, München, Deutschland

Bosch, Stuttgart, Deutschland

Tischzentrifuge Millifuge

Millipore, Schwalbach, Deutschland

Transilluminator

Ultraviolettlichteinheit

Vilber Lourmat, n. b., Frankreich

Ultrazentrifugenröhrchen

Beckmann, Deutschland

Vortexer

Wasserbad

GFL Gesellschaft für Labortechnik, Burgwedel, 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

Durch Enzymbehandlung können Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene, sogenannte „*human umbilical vein endothelial cells*“ (HUVEC), aus der Nabelschnurvene isoliert werden.

Die Nabelschnur wird zunächst nahe der Plazenta durchtrennt. Transportiert wird die Nabelschnur in einem sterilen geschlossenen Glasgefäß, das ca. mit 80 ml mit Antibiotika versetztem sterilen PBS gefüllt ist. Bis zur Weiterverarbeitung wird das Glasgefäß mit der enthaltenen Nabelschnur im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

Zuerst wird die Nabelschnur in ein Becherglas mit 70 % (v/v) technischem Ethanol eingetaucht und dann in ein Becherglas mit sterilem PBS gelegt. Beide Enden der Nabelschnur werden hinter der abgebundenen Stelle abgeschnitten. Aus einem 16 G dicken Venenverweilkatheter wird die Kanüle verworfen. Der verbliebene Katheter wird vorsichtig in die Nabelschnurvene eingeführt und mit einer Klammer oder mit den Fingern fixiert, so dass auch unter erhöhtem intravenösem Druck keine Flüssigkeit wieder aus der Vene herausfließt. Mit sterilem PBS in einer 10 ml Spritze wird die Nabelschnur nun solange durchspült, bis kein venöses Blut mehr visuell herausfließt. Anschließend wird das überschüssige PBS mit auf 37 °C erwärmter 0,05 % (w/v) Kollagenase-A-Lösung ausgespült und an dem dem Katheter entgegengesetzten Ende der Nabelschnur wird das Ende mit einer Metallklammer abgeklemmt. Die Nabelschnur wird dann mit der Kollagenase-Lsg. prall gefüllt. Der Katheter kann nun vorsichtig gezogen werden, nachdem die Nabelschnur unterhalb der Fixierung mit einer weiteren Metallklammer abgeklemmt wurde. Die Nabelschnur mit den Metallklemmen wird dann in ein Becherglas mit sterilem PBS gelegt und im Wasserbad bei 37 °C 7 min inkubiert.

Nach der Inkubationszeit wird die Nabelschnur mit den Fingern gut durchmassiert, damit sich die Endothelzellen besser lösen können. Unterhalb einer Klemme wird eine weitere

Klemme angebracht und die Nabelschnur zwischen den beiden Klemmen mit einem Skapell durchtrennt. Die letztangebrachte Klemme wird jetzt geöffnet und der Inhalt der Nabelschnurvene kann in ein 50 ml Greinerröhrchen, befüllt mit ca. 10 ml HUVEC-Medium, einlaufen. Die Zellsuspension wird für 5 min mit 1.200 rpm bei Raumtemperatur abzentrifugiert. Der Überstand wird verworfen. Das Zellpellet wird in ca. 5 ml HUVEC-Medium resuspendiert und in Zellkulturgefäße ausgesät. Die Zellkultur wird nach Adhäsion der Zellen mit sterilem auf 37 °C erwärmtem PBS mehrmals gespült und anschließend wieder mit frischem Medium versorgt. Die Waschschrirte dienen dazu, die noch vorhandenen Erythrozyten zu beseitigen, die durch die enzymatische Auflösung von Blutkoageln in die Kultur gelangt sind. Die Endothelzellen befinden sich in der Passage Null (Jaffe et al. 1973, Marin et al. 2001).

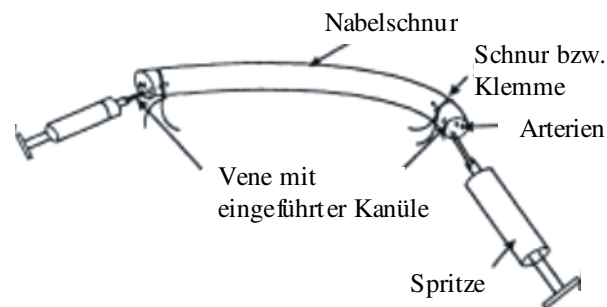


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Isolierung von Endothelzellen aus einer Nabelschnurvene (verändert nach Marin et al. 2001)

3.1.2 Passagieren von Zellen

Die Zellen werden in Brutschränken bei 37 °C und 5 % Kohlendioxid enthaltender, wasserdampfgesättigter Luft kultiviert. Das Nährmedium wird beim Passagieren abgenommen, die Zellen einmal mit einer 37 °C warmen ATV- Lösung gewaschen und mit ca. 1 - 3 ml ATV- Lösung solange inkubiert, bis sich die Zellen ablösen. Danach werden die Zellen in 5 bis 10 ml Medium aufgenommen und z. B. im Verhältnis 1:5 auf neue

Zellkulturflaschen verteilt. Bei den Endothelzellen sollte die ATV-Lösung vorher abzentrifugiert werden.

3.1.3 Zellkultur adhärenter Zelllinien

Adhärente Zellen, wie z. B. Vero-, EAhy 926 werden mit Natriumhydrogencarbonat-gepufferten MEM 5 % FKS, Antibiotikum (Penicillin/Streptomycin) im 37 °C-Brutschrank unter 5 % Kohlendioxid-Begasung in einer liegenden Zellkulturflasche kultiviert. Zur Kultivierung der Vero-hSLAM- Zellen und der PBMCs wird RPMI 1.640 mit 10 % FKS als Nährmedium verwendet.

Zur Kultivierung der HUVECs dient das Endothelial Cell Growth Medium 2 (PromoCell), für die HBMECs das Endothelial Cell Growth Medium MV (PromoCell).

Zur Ausbildung von *polarisierten Endothelzellen* werden diese auf Transwellfiltern im Brutschrank bei 37 °C unter 5 % Kohlendioxid- Begasung drei Tage kultiviert. Jeden Tag erfolgt ein apikaler und basolateraler Mediumwechsel. Bei Benutzung von 6 well-Transwellfiltern werden 1×10^6 Zellen pro Filter ausgesät. Für die Transmigrationsversuche werden Filter mit einer Porengröße von 8 μm und bei der Bestimmung der apikalen bzw. basolateralen Verteilung der MV Glykoproteine H und F Filter mit einer Porengröße von 0,4 μm eingesetzt.

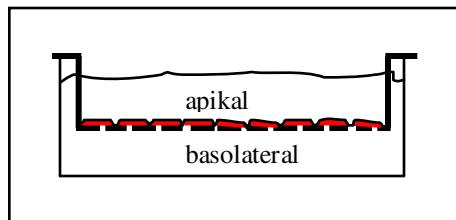


Abbildung 3.2: Transwellfiltersystem

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zur Kryokonservierung werden die Zellen abgelöst im entsprechenden Medium resuspendiert und für 5 min bei 1.200 rpm bei 4 °C abzentrifugiert. Anschließend wird das Zellpellet im vorgekühlten Einfriermedium (FKS mit 10 % DMSO) resuspendiert. Die Zelldichte sollte etwa einer Konzentration von 1×10^6 bis 1×10^7 Zellen pro ml entsprechen. Die Zellsuspension wird dann auf vorgekühlte und beschriftete Kryoröhrchen verteilt und sofort in eine Einfrierbox (Nalgene™ Cyro 1°C Freezing Container, Kat.-Nr. 5100-0001) gegeben. Diese Einfrierbox wird über Nacht auf -80 °C gekühlt und hat eine Abkühlungsrate von 1 °C pro min. Am nächsten Tag können die Kryoröhrchen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt werden.

Zur Reaktivierung werden die eingefrorenen Zellen schnell bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut, mit einem Überschuss an Kulturmedium versetzt, um das zelltoxische DMSO, das als Zellstabilisator dient, zu verdünnen. Nach 5 minütiger Zentrifugation bei 1.200 rpm wird das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in einer Zellkulturflasche ausgesät.

3.1.5 Bestimmung der Lebendzellzahl

Eine Zellsuspension und eine 0,4 % (w/v) Trypanblaulösung werden im gleichen Verhältnis gemischt, 5 min bei RT inkubiert. Davon werden 10 µl abgenommen und in ein Hämocytometer mit einer Einteilung nach Neubauer pipettiert. Tote oder geschädigte Zellen nehmen den Farbstoff auf, d. h. das Zytoplasma und der Zellkern erscheinen blau.

Die Zellzahl berechnet sich nach den nachfolgenden Formeln:

Zellzahl/ml = Durchschnittliche Zahl der Zellen pro Quadrat x Verdünnungsfaktor x 10.000

Gesamtzellzahl = Zellen/ml x Ausgangsvolumen der Suspension

Lebensfähigkeit der Zellen (%) = Anzahl lebender Zellen geteilt durch die Summe aller (gefärbter und ungefärbter) Zellen x 100 %

3.1.6 Isolierung humaner primärer mononuklearer Zellen

Das für die Isolierung der PBMC verwendete Leukozytenkonzentrat wird aus dem Blut gesunder freiwilliger Spender aus der Abteilung der Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinik Würzburg gewonnen.

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

Das Leukozytenkonzentrat wird zuerst im Verhältnis 1:6 mit Versene verdünnt und nachfolgend auf das Leukozyten-Separation Medium geschichtet. Dabei sollte nicht mehr als 30 ml Leukozytenlösung auf 9 ml Leukozyten-Separationsmedium überschichtet werden, um eine schlechte Auftrennung der Zellen zu vermeiden. Bei nachfolgender Dichtegradientenzentrifugation (30 min, 2 min Anlauf, 2 min Auslauf, 1.200 rpm, 4 °C) werden die enthaltenen zellulären Bestandteile anhand ihrer unterschiedlichen Dichte aufgetrennt. Die entstandene Interphase (PBMC) wird mit einer Pasteurpipette aufgenommen, in ein 50 ml Röhrchen überführt und mehrmals mit sterilem PBS bei 1.200 rpm für 5 min bei RT gewaschen.

Zur Charakterisierung der PBMC werden die Zellen mit folgenden monoklonalen Antikörpern gegen CD3 FITC (T-Zellen), CD19 FITC (B-Zellen), CD14 FITC (Monozyten) und HLA-DR PE gefärbt.

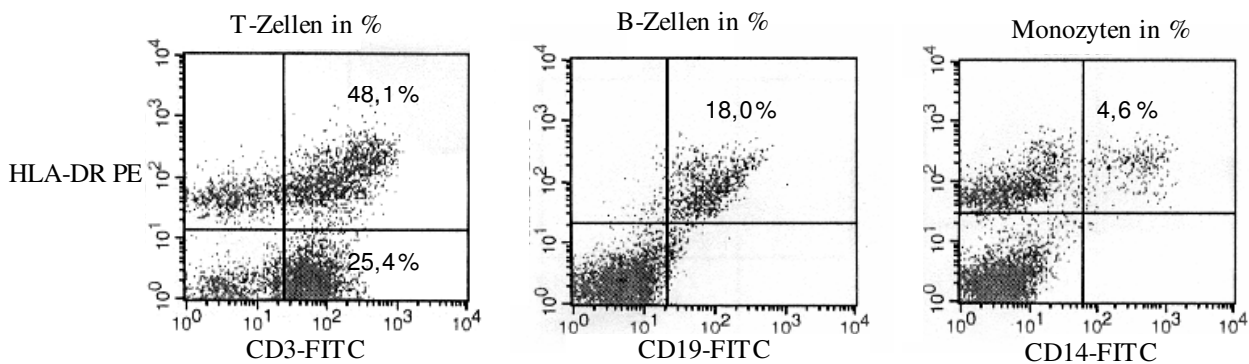


Abbildung 3.3: Durchflusszytometrische Charakterisierung der PBMC Population

3.2. Virologische Methoden

3.2.1 Virusvermehrung

Für die Virusvermehrung von attenuierten Masernvirusstämmen, hier als Vertreter Edm und recombinantes FHY/A werden Vero-Zellen verwendet.

Für die Amplifikation von virulenten Masernvirusstämmen, hier Wildtyp rMV_{IC323eGFP}, werden die Vero-hSLAM Zellen eingesetzt.

Zur Vorinfektion wird eine ca. 70 % konfluente Zellkulturflasche mit MV mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 0,01 im serumfreien Medium infiziert und für 60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wird das Nährmedium entfernt und durch serumhaltiges ersetzt. Die Zellkultur wird nun ca. 3 - 4 Tage bis zum Erreichen des maximalen zytopathischen Effekts (ZPE) noch vor der Lyse der infizierten Zellen im Brutschrank bei 33 °C oder 37 °C kultiviert. Um das MV isolieren zu können, wird das Medium bis auf 3 ml entfernt und die Zellkulturflasche bei -80 °C eingefroren. Die Zellen werden bei 4 °C langsam wieder aufgetaut und mit einem Zellschaber vom Boden der Zellkulturflasche gelöst. Durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren und anschließender Benutzung eines Douncers kann das zellgebundene Virus freigesetzt werden. Das Zelldebris wird für 15 min bei 4.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird in vorgekühlte Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80 °C aufbewahrt. Die Mockpräparation wird gleichzeitig zu der Viruspräparation angesetzt und bis auf den Schritt der MV-Infektion exakt gleich behandelt. Diese Präparation dient als Negativkontrolle.

3.2.2 Ultrazentrifugation von MV- Präparationen

Zur Aufkonzentrierung bzw. zur Entfernung des Mediums werden die MV-Präparationen ultrazentrifugiert. Der virushaltige Überstand wird auf einem 25 %igem (w/v) Sukrosekissen (PBS) in Ultrazentrifugenröhrchen geschichtet. Das MV wird mittels UZ für 90 min bei 25.000 rpm und 4 °C pelletiert. Das leicht durchsichtige Viruspellet wird in vorgekühltem PBS resuspendiert und auf Kryoröhrchen aliquotiert. Alle Schritte sind auf Eis durchzuführen.

3.2.3 Plaque-Test

Ein Plaque-Test wird durchgeführt, um den Virustiter einer Viruspräparation von MV als „*plaque forming units*“ (pfu/ml) bestimmen zu können. Zur Durchführung des Tests werden 2×10^5 Vero-Zellen für attenuierte MV-Stämme oder Vero-hSLAM Zellen für Wildtypmasenviren auf 6-well Zellkulturplatten ausgesät und über Nacht im Brutschrank bei 37 °C zur Adhäsion gebracht. Die zu bestimmende Virusstammlösung wird in 1:10 Verdünnungsschritten mit serumfreiem Medium angesetzt und je 1 ml davon auf 80 % konfluenten Zellen pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C wird das virushaltige Nährmedium abpipettiert, der Zellmonolayer mehrmals mit serumfreiem Medium gewaschen. Anschließend wird der Zellrasen mit auf 40 °C temperiertem Overlay-Agar überschichtet. Die Zellen werden bis zur deutlichen Ausbildung eines zytopathischen Effektes bei 37 °C inkubiert. Dann wird jedes Well mit 1 ml 1:100 in PBS verdünnter Neutralrotlösung 1,6 % (w/v) für 60 min gefärbt. Hiernach wird die Neutralrotlösung abgekippt und die Zellkulturplatten werden für weitere 24 h im Brutschrank bei 37 °C kultiviert. Die weiß erscheinenden Plaques werden ausgezählt, wobei die lebenden Zellen den roten Farbstoff aufnehmen und tote ungefärbt bleiben. Die Anzahl der Plaques gibt den reziproken Wert der infektiösen Partikel in 1 ml der Virusstammlösung wieder.

3.2.4 Virustiterbestimmung durch Endpunkttitration

Der Virustiter wird auf rMV_{IC323eGFP} adhärenenten Vero-hSLAM Zellen bestimmt. Dazu werden 1×10^4 Zellen in 96-Well-Zellkulturplatten mit jeweils 200 µl Nährmedium RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FKS ausplattiert und über Nacht im Brutschrank kultiviert. Am nächsten Tag werden die Zellen mit angesetzten Verdünnungsreihen von je 1:4 des Virusinokulums beimpft. Nach einer Inkubationszeit von ca. 3 - 4 Tagen wird aus mindestens drei Ansätzen die Verdünnungsstufe als Basis für die Auswertung genommen, die gerade noch eine deutliche Infektion zeigt. Die Titerangabe erfolgt nun in pfu/ml.

3.2.5. Inaktivierung von Masernviren

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

3.3 Histo- und zytochemische Methoden

3.3.1 Herstellung von MOWIOL®4.88

In einem Erlenmeyerkolben werden 2,4 g MOWIOL®4.88 mit 6 g Glycerin gemischt. Unter Rühren wird 6 ml aqua dest. zugegeben und für 2 h bei RT inkubiert. Zwischenzeitlich werden 2,42 g Tris-Base in etwa 80 ml aqua dest. gelöst. Der pH-Wert wird mit einer HCl-Maßlösung auf 8,5 eingestellt. Anschließend wird auf ein Volumen von 100 ml mit aqua dest. aufgefüllt. Zum Ansatz werden 12 ml von der TrisHCl- Lösung unter Rühren hinzugefügt und für etwa 15 min nun bei 50 °C auf dem Magnetheizrührer inkubiert. Um evtl. nicht gelöste Bestandteile zu entfernen, wird dann bei 4.000 rpm für 15 min zentrifugiert. 18 ml des Überstandes werden in ein 50 ml Greinerröhrchen überführt, mit 0,45 g DABCO zu einer Konzentration von 2,5 % (w/v) versetzt und bei 37 °C gelöst. Die Eindecklösung wird aliquotiert bei -20 °C aufbewahrt.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbung im Lab-Tek® II Chamber Slide

Für immunfluoreszenzmikroskopische Untersuchungen werden ca. 5×10^4 adhärente Zellen pro Kammer eines Lab-Tek® II Chamber Slide mit 8 wells ausgesät. Die Zellen werden über Nacht bei 37 °C kultiviert, um eine ausreichende Zellanhaftung zu gewährleisten. Danach werden die Zellen infiziert.

Um eine Immunfluoreszenzfärbung durchzuführen, wird zuerst das Nährmedium abgenommen. Einem Fixierungsschritt mit einer 4 % (w/v) Paraformaldehydlösung in PBS

für etwa 10 min bei RT folgt eine Permeabilisierung der Zellen mit 0,25 % (w/v) Triton X-100 in PBS für 10 min im Falle einer intrazellulären Färbung. Nach dem Waschschrift mit 500µl PBS pro well sollten die Zellen mit 5 % (w/v) BSA für 1 h bei RT inkubiert werden, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Nach erneutem Waschen werden nun die Zellen mit der entsprechenden Verdünnung des Primärantikörpers für 1 h bei 4 °C inkubiert. Es folgt darauf ein Waschschrift mit PBS und die Inkubation mit dem Sekundärantikörper Alexa Fluor® 594 oder 688 in einer Verdünnung 1:400 ebenfalls für 1 h bei 4 °C. Nach dem Waschen kann noch zusätzlich eine Kernfärbung mit DAPI, Verdünnung 1:300 in PBS, für 4 min bei RT durchgeführt werden. Abschließend erfolgt wieder ein Waschschrift und der Kammeraufsatz kann entfernt werden. Das Lab-Tek® II Chamber Slide wird kurz an der Luft getrocknet und die Zellen zusammen mit wenigen Tropfen Einbettungsmittel (MOWIOL® 4.88) oder mit Fluorochrom G mit einem Deckglas vorsichtig luftblasenfrei abgedeckt. Die Auswertung erfolgt entweder am Fluoreszenz- oder konfokalen Mikroskop.

3.3.3 Durchflusszytometrie

Die Methode der Durchflusszytometrie findet Anwendung bei der Quantifizierung verschiedener optischer Eigenschaften von Zellen. Auf der einen Seite kann die relative Größe (Vorwärtsstreulicht, FSC) und auf der anderen Seite die Granularität von Zellen (Seitwärtsstreulicht, SSC) ermittelt werden. Die Granularität der Zellen gibt Information über deren interne Komplexität. Außerdem können mit dem Durchflusszytometer spezifische Fluoreszenzen und deren Intensitäten gemessen werden. Die zu analysierenden Zellen werden in einer Trägerflüssigkeit aufgenommen und durch verschiedene Strömungen innerhalb des Durchflusszytometers voneinander getrennt. Dabei werden sie einzeln an einem Laserstrahl vorbeigeführt. Mit Hinblick auf den Ablauf der Immunfluoreszenzfärbungen unterscheidet man zwischen Oberflächen- und Intrazellulärfärbungen und zwischen Einfach- und Mehrfachfärbungen. Die Antikörper sind dazu mit Fluorochromen markiert, die durch Licht verschiedener Wellenlängen angeregt werden können. Zunächst wird die Energie vom verwendeten Fluorochrom absorbiert. Bei der Abgabe dieser Energie wird Licht längerer Wellenlänge emittiert, das durch

verschiedene Filter detektiert werden kann. Die gemessenen Fluoreszenzintensitäten verhalten sich dabei proportional zu der Anzahl der auf der Zelle gebundenen Fluorochrome. Die gemessenen optischen Signale, (Photonen), werden in elektronische Signale und Spannungsimpulse umgewandelt.

Die durchflusszytometrischen Analysen werden mit dem Durchflusszytometer FACScan™ von Becton Dickinson unter Verwendung der CellQuestPro Software durchgeführt. Das Gerät ist mit zwei Lasern mit einer Anregungswellenlänge von 488 nm und 635 nm ausgestattet.

3.3.4 Oberflächenfärbungen

Zur Anwendung für die Durchflusszytometrie werden pro Färbung ca. 2×10^5 Zellen eingesetzt, die zuerst mit 2 ml FACS-Puffer dreimal gewaschen werden. Danach werden die Zellen in 200 μ l FACS-Puffer resuspendiert und mit dem entsprechenden Antikörper für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wird jede Probe dreimal mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen, um überschüssigen, ungebundenen Antikörper zu entfernen. Bei nicht direkt markierten monoklonalen Primärantikörpern erfolgt eine weitere Inkubation mit einem fluoreszenzfarbstoffmarkierten Sekundärantikörper für 30 min auf Eis. Bei Mehrfachfärbungen wird nach dreimaligem Waschen mit FACS-Puffer eine Färbung mit einem direkt markierten monoklonalen Antikörper angeschlossen.

Nach Abschluss der Färbung wird die Analyse zügig durchgeführt. Dabei werden nach Ausgrenzung der toten Zellen die Fluoreszenzintensitäten der Zellen im Vergleich zu der Negativkontrolle eines nicht bindenden, isotypen Antikörpers gemessen.

3.3.5 Fluorometrische Messung der Adhärenz von PBMCs auf HBMEC

HBMECs (1×10^4) werden in schwarzen 96 well Platten mit transparentem flachen Boden ausgesät und über Nacht bei 37 °C bis zur Konfluenz kultiviert. Sechs Stunden vor Beginn des Adhäsionsassays werden die Zellen mit TNF- α (2 ng/ml) stimuliert. Uninfizierte und MV-infizierte (rMV_{IC323}GFP; MOI= 1) werden für 15 min bei 37 °C mit R 18 (4 μ M in RPMI

Medium 10 % FCS enthaltend) gefärbt. Die gefärbten Zellen werden anschließend dreimal mit RPMI gewaschen und 1 h mit den inhibierenden Antikörpern gegen LFA-1 und VLA-4 in einer Verdünnung von 1:30 bei 37 °C inkubiert. Pro Well werden dann 1×10^5 Leukozyten pipettiert und für 1 h bei 37 °C adhären gelassen. Danach werden nicht adhärierte Zellen entfernt durch dreimaliges Waschen mit 100 µl PBS für jeweils 2 min auf einem Rotator. Die Fluoreszenz wird bei einer Wellenlänge von 560 nm (Excitation) und 590 nm (Emission) mit Hilfe des Safire II Fluorometers von Tecan® gemessen. Die Hintergrundfluoreszenz von ungefärbten Leukozyten wird unter denselben Bedingungen gemessen und von den Messwerten abgezogen.

Die Adhäsion berechnet sich wie folgt:

F_t = Gesamtfluoreszenz, d. h. die gesamte Anzahl an hinzugefügten gefärbten Zellen
(kein Waschschrift)

F_x = Messwert der Probe

F_H = Messwert der ungefärbten Zellen, Hintergrund

$$\left[(F_x - F_H) / (F_t - F_H) \right] \times 100 \% = \% \text{ Adhäsion}$$

3.3.6 Fluorometrische Messung der Permeabilität mit FITC-Dextran

Zur fluorometrischen Messung der Permeabilität der HBMECs werden diese zuerst auf Transwellfiltern (6-well Format) mit 1×10^6 Zellen pro Filter ausgesät und im Brutschrank bei 37 °C unter CO₂ Begasung kultiviert. Zur Durchführung des Versuches wird eine 4 kDa FITC-Dextran Lösung mit 1 mg pro ml in P-Puffer angesetzt. In die apikale Filterkammer wird nun 770 µl FITC-Dextran Lösung und in die basolaterale Kammer 1000 µl P-Puffer hinzugefügt (Boyle et al. 2006). Der Lösung wird nun 10 min Zeit gelassen zu diffundieren. Danach wird 5 µl des basolateralen Mediums entnommen und mit 95 µl P-Puffer verdünnt. Diese 100 µl werden nun in ein Well einer schwarzen 96-well Platte pipettiert. Im Fluorometer wird dann die Fluoreszenzintensität des FITC-Dextrans gemessen.

3.4 Proteinbiochemische Methoden

3.4.1 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration von Zelllysaten wird mit dem Bicinchoninsäuretest durchgeführt. Dieses System basiert auf der Reduktion von zwei- zu einwertigem Kupfer durch Proteine. Diese reagieren dann mit Bicinchoninsäure zu violetten Komplexen, deren maximale Absorption bei 562 nm liegt. Die Absorption ist direkt proportional zur Proteinkonzentration.

Bei diesem Test werden 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung mit 2 ml einer Verdünnung von 1:50 Kupfer-II-Sulfat-Lösung in Biconchoninsäure versetzt, gevortext und für 30 min im 37 °C Wasserbad inkubiert. In einer Kunststoffküvette wird die Absorption bei 562 nm gegenüber einer Standardlösung gemessen. Als Nullwert dient 10 µl Lysispuffer mit 2 ml der bereits erwähnten Verdünnung.

Die Proteinkonzentration kann nun mit dem BCAmikro Programm des BioPhotometers mit Eingabe der entsprechenden Parametern bei einer Wellenlänge von 563 nm ermittelt werden.

3.4.2 Herstellung von Zelllysaten

Zum Nachweis von Proteinen mittels der Western-Blot-Analyse wird ein Lysat der zu untersuchenden Zellen hergestellt. Danach erfolgt dann die Auftrennung der Proteine mittels der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese und Visualisierung in der Western-Blot-Analyse mit einem antikörperspezifischen Epitop.

Um ein Zelllysat herstellen zu können, werden die Zellen zunächst bei 1.200 rpm bei 4 °C pelletiert. Das Zellpellet wird mehrmals mit 1 ml eiskaltem PBS in einem Reaktionsgefäß (Eppendorf) für 5 min bei 1.200 rpm bei 4 °C gewaschen. Bei 10^7 Zellen werden 500 µl 1 % NP-40-Lysispuffer hinzugefügt, gemischt und auf Eis für 45 min lysiert. Nach dem Schritt der Lysierung werden die Zellkerne für 15 min bei 12.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und bis zur Weiterverarbeitung bei -80 °C gelagert.

3.4.3 Biotinylierung von auf Filtern gewachsenen Zellen

Die Endothelzellen (1×10^6 pro 3 cm well) werden auf Transwell-Filtern mit $0,4 \mu\text{m}$ Porengröße ausgesät und für 3 Tage kultiviert, um einen einheitlichen Monolayer zu bekommen. Die apikale und basolaterale Seite wird nun für 30 min bei 4°C mit einer 0,5%igen S-NHS-Biotin-PBS Lsg. inkubiert. TBS-Puffer wird jeweils in die gegenüberliegende Seite hinzugefügt, um eine einseitige Biotinylierung zu gewährleisten. Danach werden die Zellen dreimal mit TBS-Puffer gewaschen, um überschüssiges Biotin zu binden. Die Zellen werden mit einem Zellschaber von der Membran gelöst, in einem 15 ml Greinerröhrchen gesammelt und dreimal mit PBS gewaschen. Das Zellpellet wird in ca. $500 \mu\text{l}$ NP-40 Lysispuffer aufgenommen und für 45 min auf Eis lysiert. Nach Zentrifugation für 15 min bei 4.000 rpm wird der Überstand abgenommen und das Pellet verworfen.

3.4.4 Immunpräzipitation

Durch die Immunpräzipitation können lysierte, z. B. biotinmarkierte Membranproteine mit Hilfe von spezifischen monoklonalen Antikörpern isoliert werden. In dem Zelllysate ($500 \mu\text{l}$) werden die viralen Glykoproteine F und H mit den mAK A504 und K83 (Verdünnung 1:100) für 1 h bei 4°C inkubiert und anschließend eine weitere Stunde mit $50 \mu\text{l}$ Protein-G-Sepharose-Beads-Suspension gefällt. Die Beads werden danach abzentrifugiert und mit RIPA-Puffer gewaschen und zum Schluss wieder mit Lysispuffer auf ein Volumen von $50 \mu\text{l}$ ergänzt. Die Proben können nun zur Weiterverarbeitung für die SDS-PAGE verwendet werden.

3.4.5 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Zur Auftrennung und Aufkonzentrierung des durch Zellyse erhaltenen Proteingemisches dient die Gelelektrophorese. Sie stellt die Grundlage für die anschließende Western-Blot-Analyse dar. Die Proteine, eingebettet in eine Polyacrylamidmatrix, werden durch die Anwesenheit von Natriumdodecylsulfat entfaltet und gleichzeitig von einer negativ

geladenen Hülle zylindrisch umschlossen. Sie werden dann nach ihrer molekularen Masse elektrophoretisch aufgetrennt. Bei der diskontinuierlichen Elektrophorese erfolgt eine Aufkonzentrierung der einzelnen Proben an der Grenze zwischen Sammel- und Trenngel. Die beiden Gele unterscheiden sich durch den pH-Wert. Außerdem liegen in den Gelen Glycinionen in unterschiedlichen Ladungszuständen vor. Als Standardgele wurden 10 % Gele verwendet.

Für ein 10%iges großes Trenngel wird benötigt:

Acrylamid/Bisacrylamid (30 %)	6,6 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,8)	7,5 ml
Aqua dest.	5,6 ml
10 % SDS	200 µl
TEMED	50 µl
20 % APS	200 µl

Mit der gleichzeitigen Zugabe von TEMED und APS wird die Polymerisation eingeleitet und aus diesem Grund sollte die Trennlösung möglichst schnell und blasenfrei bis auf etwa 4 cm unterhalb der Glasplattenkanten einer mittleren Gelelektrophoreseapparatur eingegossen werden. Anschließend wird mit Aqua dest. gesättigtem Butanol überschichtet, um eine scharfe Trennlinie zwischen den beiden Gelen zu bekommen. Die Polymerisation ist nach ca. 30 min bei RT vollendet. Das Butanol wird nun gründlich mit Aqua dest. wieder entfernt und das Trenngel kann mit dem Sammelgel überschichtet werden.

Für ein Sammelgel wird benötigt:

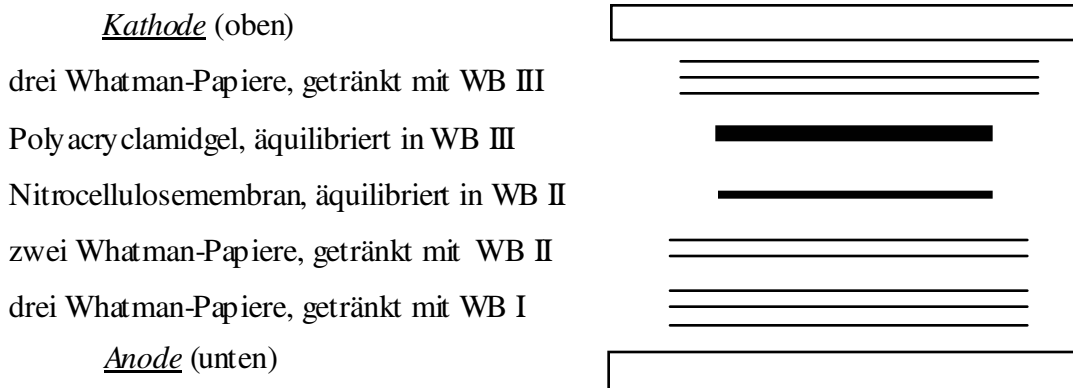
Acrylamid/ Bisacrylamid (30 %)	1,25 ml
1 M Tris-HCL (pH 6,8)	1,25 ml
Aqua dest.	7,4 ml
10 % SDS	100 µl
TEMED	20 µl
10 % APS	50 µl

Solange das Sammelgel noch flüssig ist, wird ein Kamm vorsichtig blasenfrei eingesetzt. Das Gel wird anschließend ebenfalls für 30 min bei RT polymerisiert. Die

Gelelektrophoresekammer wird zur weiteren Vorbereitung mit einfach konzentriertem Proteingellaufpuffer gefüllt und der Kamm langsam entfernt. Um Gelrückstände in den einzelnen Taschen zu entfernen, werden die Auftragesaschen vor der Beladung mit Proteinproben mit einem Proteingel-Laufpuffer sorgfältig ausgespült. Danach werden die Proteinproben mit einem 1/4 Volumen SDS-Lämmli-Probenpuffer (bei reduzierendem Puffer Zusatz von β -Mercaptoethanol) versetzt und 5 min auf 95 °C erhitzt. Sodann können die Auftragesaschen mit einem Protein-Größenmarker und den Proteinproben beladen werden. Die Gelelektrophorese erfolgt über ca. 12 h bei 10 mA pro Gel solange, bis eine deutlich erkennbare Verteilung des Proteinstandards in Hinblick auf das zu detektierenden Protein ersichtlich ist.

3.4.6 Westem-Blot

Die Westem-Blot-Analyse nach Towbin et al. 1979 dient als Nachweis und zur Größenabschätzung der nachzuweisenden Proteine aus den angefertigten Zellysaten. Die durch die PAGE aufgetrennten Proteine werden aus dem Polyacrylamidgel auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wobei das Proteinmuster und die Immunaktivität der Proteine erhalten bleiben. Die Übertragung der Proteine erfolgt mit Hilfe einer semitrockenen Blottingapparatur, indem ein Stromfluss zwischen Anode und Kathode angelegt wird. Der Aufbau sieht folgendermaßen aus.



Evtl. vorhandene Luftblasen werden mit einer Glaspipette ausgerollt. Der Transfer der

Proteine vom Gel auf die Nitrozellulosemembran erfolgt innerhalb von 1 h und 30 min bei einer Stromstärke von 120 mA. Durch die Übertragung eines vorgefärbten Protein-Größenmarkers kann der gleichmäßige und erfolgreiche Transfer der Proteine auf die Transfermembran überprüft werden.

Die unspezifischen Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran werden nun in einer Wanne auf einem Wippschüttler mit ca. 20 ml Blockierpuffer, der aus 10 % Milchpulver in PBS besteht, 2 h bei RT oder bei 4 °C über Nacht besetzt.

Nach drei Waschschritten von etwa 10 min mit PBS, 0,01 % Tween 20 enthaltend, erfolgt der Proteinnachweis auf der Transfermembran mittels spezifischer Antikörper. Diese Antikörper werden mit 5 % Blockierpuffer verdünnt und auf einem Wippschüttler 1 h bei RT inkubiert. Anschließend erfolgen weitere drei Waschschriffe von etwa 10 min mit PBS, 0,01 % Tween 20 enthaltend. Dann folgt eine 1-stündige Inkubation der Transfermembran mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper. Im Nachweisversuch der biotinylierten Oberflächen-Glykoproteine wurde als „Zweitantikörper“ Streptavidin-Peroxidase in PBS verwendet. Nach erneutem Waschen wird die Transfermembran kurz an der Luft getrocknet und die eigentliche Enzymreaktion mit dem ECL™-Reagenz gestartet. Dazu werden zuvor die ECL™-Lösungen 1 und 2 in gleichen Teilen zu einem Volumen von etwa 4 ml gemischt und damit die Nitrozellulosemembran für 5 min inkubiert. Dabei setzt die Meerrettichperoxidase (HRP) ein Substrat um, das auf einem Röntgenfilm die spezifisch markierten Proteinbanden durch die emittierten Photonen geschwärzt wird. Zum Abschluss kann der Röntgenfilm entwickelt, fixiert, gespült und analysiert werden.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung von Endothelzellen

4.1.1 Expression von Endothelzellmarkern und Adhäsionsmolekülen

Vor dem Einsatz der Endothelzellen in den Versuchen wurden die HBMECs und HUVECs auf ihre Endothelzeleigenschaften überprüft. Zu den wichtigsten Endothelzellmarkern zählt das Lektin Ulex-europaeus-Agglutinin I und der von-Willebrand-Faktor (vWF).

Abbildung 4.1 zeigt die immunfluoreszenzmikroskopische Färbung der endothel-spezifischen Bindung des Ulex-europaeus-Agglutinins I (UEA), das bei allen HUVECs und HBMECS nachweisbar war. Es bildete sich eine netzartige Oberflächenstruktur aus.

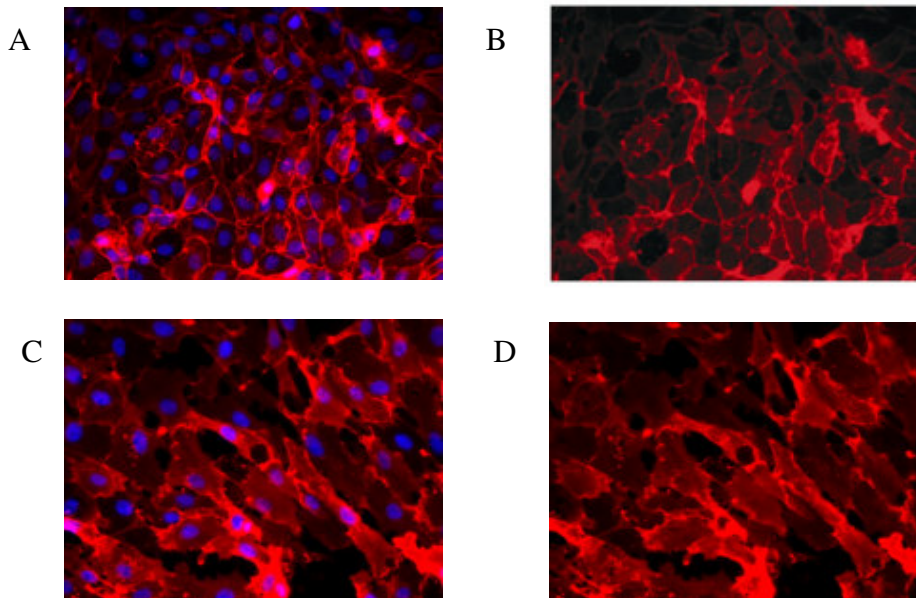


Abbildung 4.1: Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von UEA bei HUVECs und HBMECs

Immunfluoreszenzmikroskopische Bestimmung der Bindung von UEA (rot) an die Oberfläche von HUVEC p4 (A, B) und HBMEC p25 (C, D). Die Zellen wurden mit dem sekundären Antikörper Alexa-Fluor®594 (rot) gefärbt. Zellkerne zeigen eine blaue Färbung durch DAPI (A/C), einem mit der DNA-interkalierenden Farbstoff.

Abbildung 4.2 stellt die Detektion des in intrazellulären Vesikeln, den sogenannten Weibel-Palade-Körperchen, gespeicherten von-Willebrand-Faktors mittels Immunfluoreszenz dar. Bei den HUVECs in der 4. Passage konnte deren Existenz nachgewiesen werden. In Bezug auf die HBMECs in der 25. Passage gelang dieses nicht.

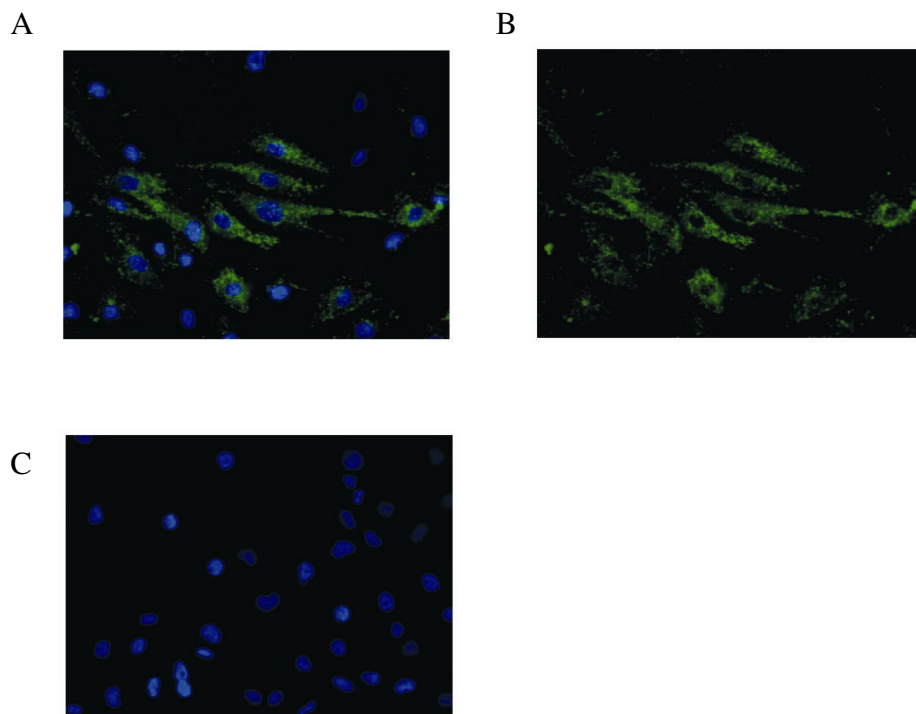


Abbildung 4.2: Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis vom vWF bei HUVECs und HBMECs
Immunfluoreszenzmikroskopische Bestimmung des endothelspezifischen vWF in HUVECs p4 (A/B) und HBMEC (C). Die Zellen wurden mit dem Alexa-Fluor®488-konjugierten Sekundär-Antikörper gefärbt (grüne Färbung). Zellkerne zeigen eine blaue Färbung durch DAPI (A/C), einem in die DNA interkalierenden Farbstoff.

4.1.2 Überprüfung der Polarisierung von Endothelzellen

Die Polarisierung konnte mittels Messung des elektrischen Widerstandes aufgrund von zu großen Schwankungen der Messwerte nicht festgestellt werden. Stattdessen wurde nach 3-tägiger Kultivierung der Endothelzellen auf den Transwellfiltern die unterschiedlicher, biotinylierter Oberflächenproteine auf der apikalen und basolateralen Seite anhand einer

12 % SDS-PAGE mit anschließendem Western-Blot dargestellt. Die Detektierung der Proteine wurde mit Hilfe von Streptavidin-Peroxidase und ECL durchgeführt. Zusätzlich wurde untersucht, ob die Aktivierung der HBMECs durch TNF- α einen Einfluss auf die Polarisierung hat.

Abbildung 4.3 zeigt das unterschiedliche Bandenmuster der apikalen und basolateralen Seite der EAhy926, HUVECs und HBMECs mit bzw. ohne TNF- α und somit die erfolgreiche Polarisierung. Die Aktivierung der HBMECs durch TNF- α zeigte keinen negativen Einfluss auf die Polarisierung. Als Kontrolle für unpolarisierte Zellen wurden die Verozellen eingesetzt, die gleiches Bandenmuster auf beiden Seiten zeigten.

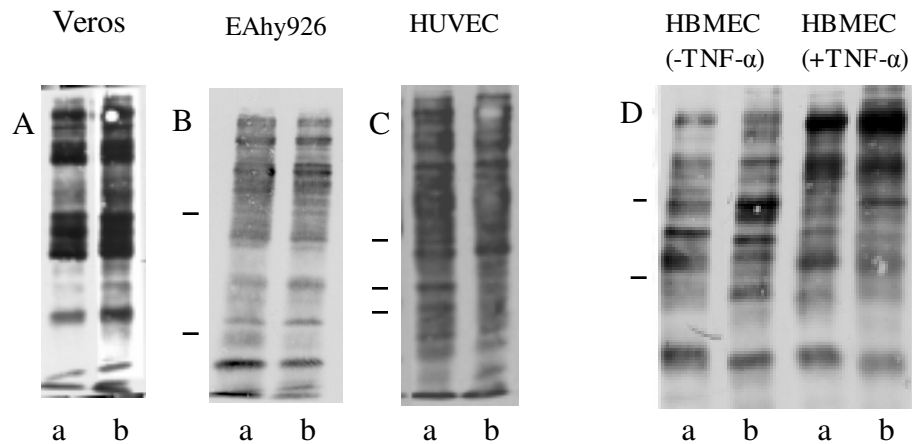


Abbildung 4.3: Darstellung der biotinylierten Oberflächenproteine von polarisierten Endothelzellen

(A) Verozellen als Kontrolle für unpolarisierte Zellen, (B) polarisierte EAhy926, (C) polarisierte HUVECs, (D) polarisierte HBMECs ohne vorherige Aktivierung durch TNF- α , (E) polarisierte HBMECs nach 6-stündiger Aktivierung durch TNF- α . Pfeile: unterschiedlich exprimierte Oberflächenproteine auf der apikalen (a) und basolateralen (b) Seite. Belichtungszeit: 10 sek.

4.1.3 Nachweis des ZO-1 Proteins in HBMECs

Als Beweis für einen konfluenten Monolayer wurde das ZO-1 Protein in der Immunfluoreszenz nachgewiesen. Dieses Protein ist ein Bestandteil der „tight junctions“, die sich nur ausbilden, wenn ein dichter Zellrasen, also Zell-Zell Kontakt, besteht. Ebenfalls erfolgte die Kontrolle, ob die Aktivierung der HBMECs durch TNF- α und die nach einer

Transmigration übrig gebliebenen adhärten PBMCs einen Einfluss auf die Konfluenz haben.

Abbildung 4.4 zeigt die Ausbildung von „tight junctions“ durch den Nachweis des ZO-1 Proteins in HBMECs nach 3-tägiger Kultivierung auf den Transwellfiltern. Die Zellen wurden mit 4 % PFA fixiert, mit Triton x-100 permeabilisiert, mit dem Antikörper gegen das ZO-1 Protein inkubiert und anschließend gefärbt durch den Zweitantikörper Alexa-Fluor®488 (grün). Die 6-stündige Zugabe von TNF- α und die adhärten PBMCs beeinflussten die Konfluenz des Monolayers nicht.

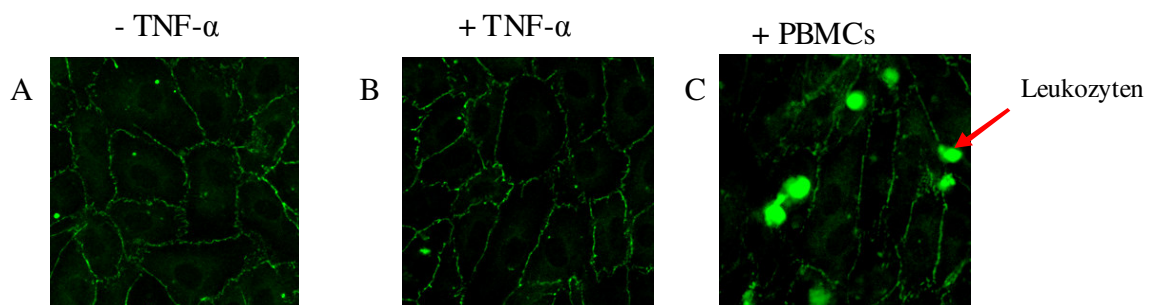


Abbildung 4.4: Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des ZO-1 Proteins

(A) Kontrolle: konfluente HBMECs ohne Aktivierung, (B) konfluente HBMECs nach 6-stündiger Zugabe von TNF- α , (C) konfluente HBMECs mit adhärten Calcein-gefärbten Leukozyten.

4.1.4 Überprüfung der Permeabilität von HBMECs

Zur Bestimmung der Dichte des Zellrasens bzw. der Permeabilität der HBMECs wurde eine Verlaufskurve erstellt. 24 h, 48 h und 72 h nach Aussaat der Endothelzellen auf den Filtern (Porengröße 8 μm) wurden diese auf die Permeabilität für das 4 kDa Dextran, konjugiert mit Fluoresceinisothiocyanat, getestet. Als Messwerte dienen die Fluoreszenzintensitäten des FITC-Dextrans. Das Experiment wurde als Doppelansatz durchgeführt. Abbildung 4.5 zeigt, dass die Endothelzellen am dritten Tag ihre geringste Durchlässigkeit für FITC-Dextran aufwiesen.

	1. Messwert	2. Messwert	Durchschnitt
Filter 24h	6278	8019	7150
Filter 48 h	7455	7820	7640
Filter 72 h	8166	8064	8115
HBMEC 24 h	2302	2195	2250
HBMEC 48 h	1316	1158	1237
HBMEC 72 h	562	447	505

Tabelle 4.1: Messwerte der Fluoreszenzintensitäten von FITC-Dextran

Messung der Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran nach 10-minütiger Diffusion durch Filter ohne darauffolgendem Endothelzellmonolayer (Kontrolle) im Vergleich zur Diffusion von FITC-Dextran durch Filter mit darauffolgendem uniniziertem EZ-Monolayer zum Zeitpunkt 24 h, 48 h und 72 h der EZ-Kultivierung.

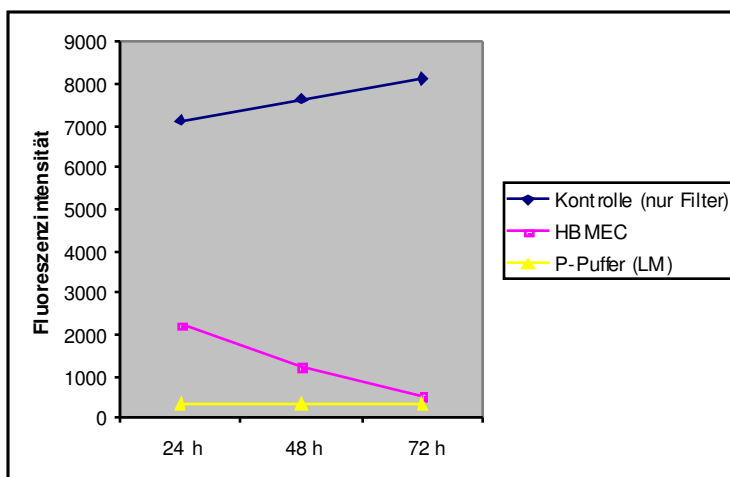


Abbildung 4.5: Graphische Darstellung der Permeabilität von einem uniniziertem EZ-Monolayer

Angabe der Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran als Maß für die Permeabilität.

Permeabilität eines Monolayers mit uninizierten HBMECs (pink) im Vergleich zur Permeabilität von einem Filter ohne Zellen (blau) und Fluoreszenzintensität des Lösungsmittels (gelb) im Zeitraum von drei Tagen.

Im nächsten Versuch wurde analysiert, ob die Infektion der Endothelzellen einen negativen Einfluss auf die Permeabilität hat. Die Endothelzellen wurden drei Tage nach Kultivierung im Brutschrank bei 37 °C mit dem rMV_{IC323eGFP} mit einer MOI= 1,0 infiziert. Es konnte in diesem Versuch nur ein Zeitraum von 48 h untersucht werden, weil der Monolayer durch

die Infektion nach 48 h nicht mehr konfluent war. Wie in Abbildung 4.6 zu sehen ist, zeigt die Infektion innerhalb der ersten 48 h keinen signifikanten Einfluss auf die Permeabilität eines Monolayers mit infizierten HBMECs im Vergleich zum Monolayer mit uninfizierten EZ.

	1. Messwert	2. Messwert	Durchschnitt
HBMEC 24h	1955	952	1454
HBMEC 48 h	950	993	972
mit Infektion			
HBMEC 24 h	1344	1792	1568
HBMEC 48 h	1411	1157	1284

Tabelle 4.2: Messwerte der Fluoreszenzintensitäten von FITC-Dextran

Messung der Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran nach 10 minütiger Diffundierung durch Filter mit darauf liegendem Monolayer mit uninfizierten HBMECs im Vergleich zu mit $rMV_{IC323eGFP}$ MOI= 1 infizierten HBMECs.

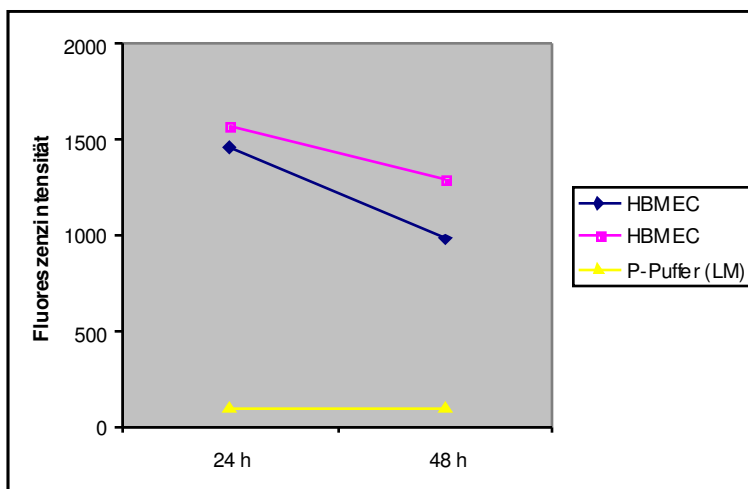


Abbildung 4.6: Graphische Darstellung der Permeabilität eines infizierten EZ-Monolayers

Angabe der Fluoreszenzintensität von FITC-Dextran als Maß für die Permeabilität.

Permeabilität eines Monolayers mit uninfizierten HBMECs (pink) im Vergleich zu uninfizierten (blau) und Fluoreszenzintensität des Lösungsmittels (gelb) im Zeitraum von zwei Tagen.

4.1.5 Expression von E-Selektin (CD62), VCAM (CD106) und ICAM (CD54)

Es ist aus der Literatur bekannt, dass eine Zugabe von TNF- α die Expression der Adhäsionsmoleküle auf mikrovaskulären Endothelzellen steigert (Stins et al. 1997). Mittels der Durchflusszytometrie wurde die Expression von E-Selektin, VCAM und ICAM bei HUVECs und HBMECs nach 6-stündiger Stimulation mit TNF- α (25 ng/ml) gegenüber der unbehandelten Probe gemessen. Dafür wurden 4×10^5 HUVECs und 6×10^5 HBMECs pro Well einen Tag zuvor in 6-well Platten ausgesät. Am Tag des Versuchs wurden die Zellen, nachdem sie mit TNF- α 6 Stunden stimuliert worden waren, mit ATV abgelöst. Die Färbung erfolgte mit spezifischen Antikörpern gegen CD62, CD54 und CD106 in einer 1:100 Verdünnung. Als Zweitantikörper diente ein Ziege-anti-Maus Antikörper in derselben Verdünnung.

Einen Vergleich der Expression der Adhäsionsmoleküle CD62, CD54 und CD106 durch HUVEC und HBMEC mit und ohne Stimulierung präsentiert Abbildung 4.7. HUVECs wiesen nach Stimulierung bei allen drei Adhäsionsmolekülen ein erhöhtes Expressionsmuster auf. Überraschenderweise zeigte sich bei den HBMECs nur ein geringer Effekt von TNF- α auf das Expressionslevel von E-Selektin und VCAM, wobei die Fluoreszenzintensität von E-Selektin ohne Stimulans auch nicht stark von der Kontrolle abwich.

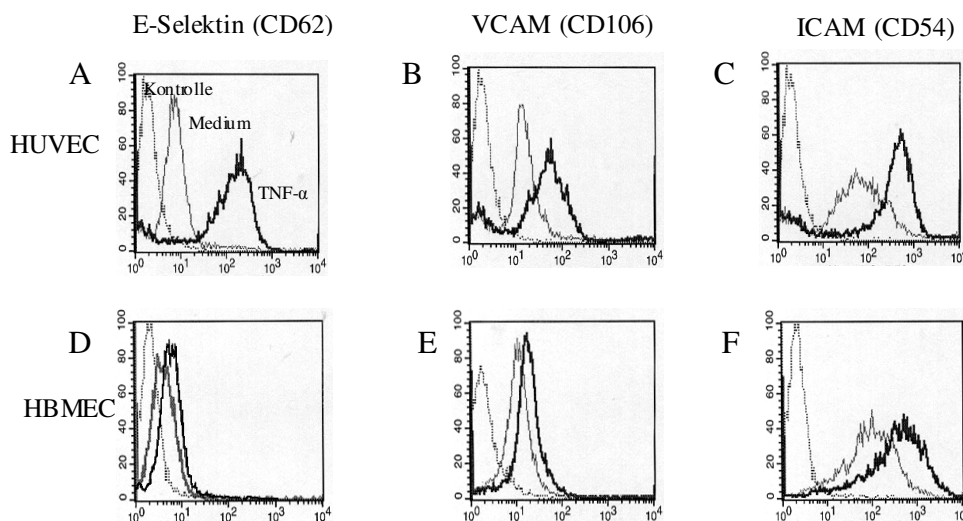


Abbildung 4.7: Zytometrische Darstellung von CD62, CD106 und CD54

Durchflusszytometrische Quantifizierung der Adhäsionsmoleküle CD62 (A/D), CD106 (B/E) und CD54 (C/F) bei HUVEC (A/B/C) und HBMEC (D/E/F) nach 6-stündiger Stimulation gegenüber den unstimulierten Zellen.

Aufgrund des erfolgreichen Nachweises des Einflusses von $\text{TNF-}\alpha$ bezüglich einer gesteigerten Expression der Adhäsionsmoleküle auf den Endothelzellen, wurden in allen durchgeführten Transmigrationsversuchen die Endothelzellen zu Beginn, d. h. vor Zugabe der PBMCs, 6 Stunden mit $\text{TNF-}\alpha$ stimuliert.

4.2 Effekt der MV-Infektion auf die T-Zell Migration

Im Folgenden sollte untersucht werden, ob MV infizierte T-Zellen durch Endothelzellen transmigrieren können. Dazu wurden T-Zellen stimuliert, infiziert und ihr Wanderungsverhalten durch Filter alleine und in Gegenwart der Endothelzellschicht analysiert.

4.2.1 Charakterisierung der Stimulation durch Nachweis von CD69

Zu Beginn wurden die PBMCs für 48 h mit Phytohämagglutinin-L (PHA) ($5\mu\text{g/ml}$) stimuliert, um eine Expression von CD150 zu erreichen. Die Expression von CD150 war Voraussetzung für die nachfolgende Infektion der PBMCs mit $\text{rMV}_{\text{IC323eGFP}}$.

Abbildung 4.8 zeigt die Überprüfung der Stimulation der Zellen mit PHA mit dem Ergebnis, dass 48 h nach PHA Zugabe 62 % der PBMCs CD69 und CD3 positiv waren.

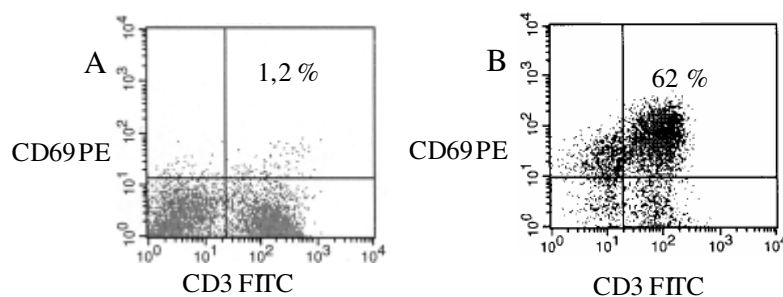


Abbildung 4.8: Zytometrische Darstellung der CD69 Expression von PBMCs

Durchflusszytometrische Quantifizierung des Aktivierungsmarkers (CD69 PE) und des T-Zellmarkers (CD3 FITC) im unstimulierten (A) und im stimulierten Zustand (B) 48 h nach PHA Zugabe.

4.2.2 Untersuchung der CD150 Expression

Im nächsten Schritt wurde überprüft, ob diese Aktivierung zu einer erhöhten SLAM Expression geführt hat. 48 h nach PHA-Zugabe wurde eine zytometrische Messung mit den Antikörpern gegen CD3, als T-Zell Marker, und CD150 durchgeführt. Dies ist in Abbildung 4.9 dargestellt. Es zeigte sich, dass 48 h nach Aktivierung 43 % der PBMCs CD3 und SLAM positiv waren.

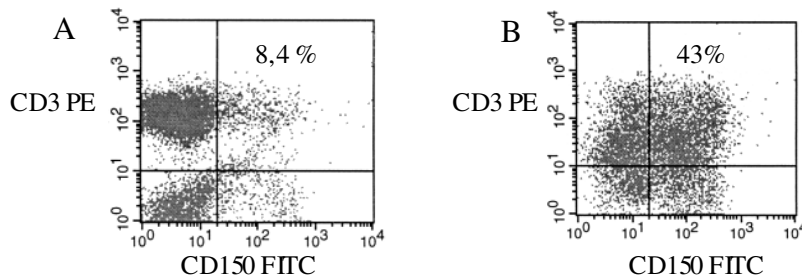


Abbildung 4.9: Zytometrische Darstellung der CD150 Expression von PBMCs

Durchflusszytometrische Quantifizierung der Expression von SLAM (CD150 FITC) und CD3 im unstimulierten (A) und stimulierten (B) Zustand 48 h nach PHA Zugabe auf PBMCs.

Die SLAM Expression auf stimulierten PBMCs ermöglichte die Infektion der Zellen mit rMV_{IC323eGFP}.

Der Transmigrationsversuch wurde nun unter Berücksichtigung zweier unterschiedlicher Zeitschemata durchgeführt. Es galt herauszufinden, ob der Zeitpunkt der Infektion der PBMCs einen Einfluss auf das Transmigrationsverhalten der Leukozyten hat. Aus diesem Grund erfolgte die Migration in einem Fall 2 h nach Infektion (früh) und im anderen 32 h nach Infektion (spät). Um den Infektionsgrad unabhängig von der Analyse der Migration zu messen, wurde in beiden Fällen die FACS Analyse 48 h nach Infektion durchgeführt. Der Zeitpunkt 48 h nach Infektion zeigte die höchste eGFP Expression. Diese wurde als Maß für die Infektion angesetzt.

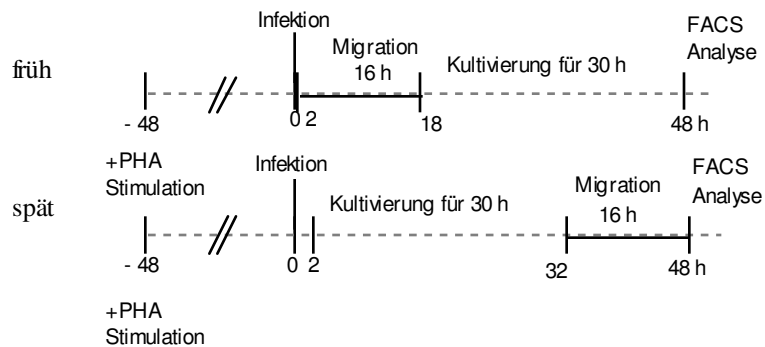


Abbildung 4.10: Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Transmigration

Zu Anfangs erfolgte die Stimulation von PBMCs mit PHA für 48 h und dann die Infektion mit $rMV_{IC323eGFP}$. Früh: Durchführung der 16-stündigen Transmigration 2 h nach Infektion mit anschließender separater Kultivierung der Zellen von der apikalen und basolateralen Kammer für 30 h. Spät: 2 h nach Infektion erfolgte die Kultivierung der PBMCs für 30 h. Nachfolgend Durchführung der 16-stündigen Transmigration. In beiden Fällen wurden die Zellen 48 h nach Infektion im FACS analysiert.

4.2.3 Bestimmung der infizierten T-Zellen in Prozent

In den Transmigrationsversuchen wurden die PBMCs mit dem $rMV_{IC323eGFP}$ mit einer MOI=1 infiziert. Zur Bestimmung des prozentualen Anteils an infizierten T-Zellen wurde mit dem Durchflusszytometer die GFP- Expression gemessen.

Abbildung 4.11 zeigt ein Beispiel, wobei 22 % der PBMCs infizierte T-Zellen sind, d. h. CD3 und eGFP positiven Zellen.

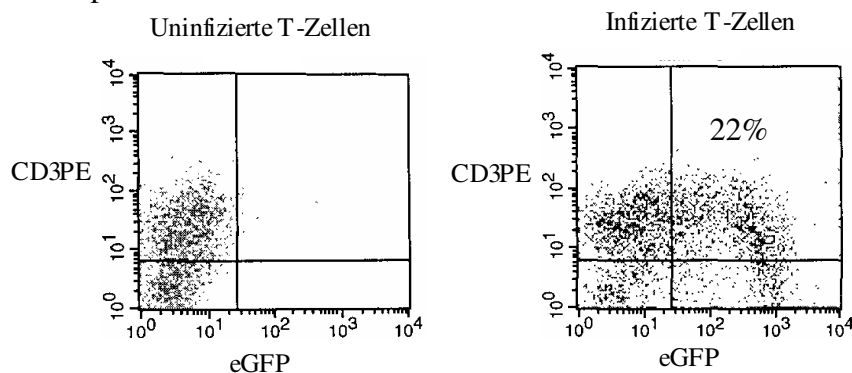


Abbildung 4.11: Durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils an infizierten T-Zellen von der Gesamtkultur

Der untere linke Quadrant zeigt die CD3 und eGFP negativen Zellen, der obere linke Quadrant die CD3 positiven Zellen, die eGFP negativ sind. Der untere rechte Quadrant gibt die Anzahl an eGFP positiven und CD3 negativen Zellen an und der obere rechte Quadrant die infizierten CD3 positiven Zellen (22%).

4.2.4 Bestimmung der absoluten und prozentualen Anzahl an infizierten T-Zellen aus der apikalen und basolateralen Filterkammer

Für den Transmigrationsversuch wurden pro well 1×10^6 PBMCs ins apikale Medium pipettiert.

Die T-Zellen, die transmigriert waren, (in der basolateralen Kammer) und die T-Zellen, die im apikalen Medium verblieben waren, wurden gezählt. Dafür musste natürlich zuvor das Medium der apikalen und basolateralen Filterkammer in zwei getrennte FACS Analysenröhrchen überführt worden sein. Die Zellen wurden zunächst herunterzentrifugiert und das überschüssige Medium abgekippt. Das verbliebene Volumen an Medium z. B. 210 μl wurde ermittelt und die Zellen mit einer Zellkammer gezählt. Mit Hilfe des Volumens z. B. 210 μl und der Zellzahl z. B. 148 konnte die absolute Anzahl an Zellen z. B. $3,1 \times 10^5$ bestimmt werden, die sich im FACS-Röhrchen befand. Darauf folgte die Antikörperfärbung und Auswertung im FACS. Abbildung 4.12 zeigt, wie die Transmigrationsversuche durchflusszytometrisch ausgewertet wurden.

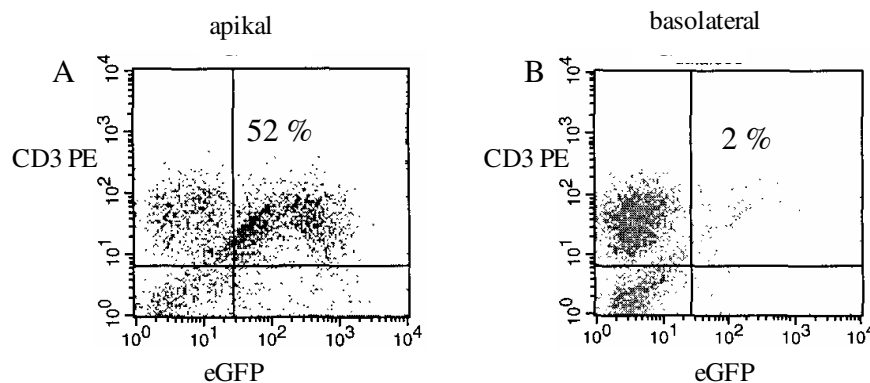


Abbildung 4.12: Zytometrische Analyse des Transmigrationsversuchs

(A) Oberer rechter Quadrant: Anzahl an CD3 und eGFP positiven Zellen der apikalen Filterkammer (52 %).

(B) Oberer rechter Quadrant: Anzahl an CD3 und eGFP positiven Zellen der basolateralen Kammer (2 %).

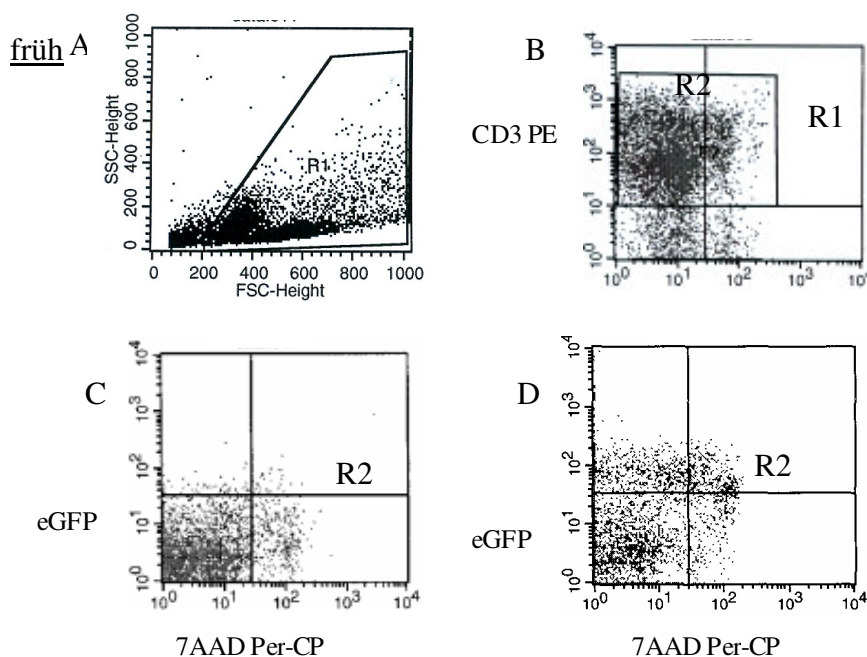
Rechenbeispiel:

Basolateral 1×10^5 PBMCs insgesamt ——— davon 2 % CD3 und eGFP positiv, d. h. 2×10^3 infizierte T-Zellen sind gewandert. Wenn z. B. die PBMC Kultur aus 70 % T-Zellen besteht, wurden von 1×10^6 PBMCs 700.000 T-Zellen eingesetzt. Sind in dem Versuch z. B.

21 % der T-Zellen infiziert gewesen, entspricht dies 147.000 infizierten T-Zellen, die zu Beginn des Versuchs in die apikale Kammer pipettiert worden sind. Wird nun durch die FACS Analyse ermittelt, dass sich nur noch 2×10^3 infizierte T-Zellen im basolateralen Medium befanden, entspricht dies einer Transmigrationsrate von 1,4 %.

4.2.5 Bestimmung der Anzahl an toten Zellen nach Infektion

Nach der erfolgreichen Aktivierung der T-Zellen und Stimulation der SLAM-Expression musste analysiert werden, welchen Einfluss die Infektion auf die Lebensfähigkeit der T-Zellen innerhalb der ersten 48 h nach Infektion hat. Dazu wurde die Transmigration einmal nach dem Schema „früh“ und einmal nach „spät“ durchgeführt. In diesem Transmigrationsversuch und in allen nachfolgenden wurden die Chemokine MCP-1 (5 ng/ml) und Rantes (5 ng/ml) in die basolaterale Filterkammer als Chemokingradienten hinzupipettiert, da aus bereits veröffentlichten Studien bekannt ist, dass diese Chemokine die Chemotaxis und die Transmigration von Monozyten, Lymphozyten und Granulozyten stimulieren (Mukaida et al. 1998). Die Zellen wurden mit CD3 Antikörper und 7AAD markiert. Zur Auswertung der 7AAD und eGFP positiven Zellen wurden nur die CD3 positiven T-Zellen verwendet (Region= R2). Die nachfolgenden FACS-Graphiken stellen die T-Zellen in Abhängigkeit der Infektion (eGFP) und 7AAD dar.



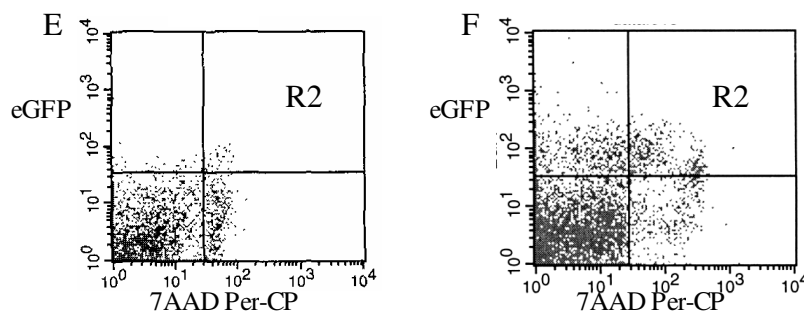
spät

Abbildung 4.13: Zytometrische Darstellung von 7AAD markierten T-Zellen

Transmigration wurde durchgeführt nach dem Schema „früh“ (C/ D) und „spät“ (E/ F). (C, E) zeigen uninfierte und (D/ F) infizierte T-Zellkulturen aus der basolateralen Filterkammer in Abhängigkeit von der Infektion (eGFP). Tote Zellen sind 7AAD positiv.

Ergebnis von drei unabhängigen Experimenten (Mittelwert mit Angabe der Standardabweichung):

früh

- 1) GFP positiv, insgesamt: 11 % \pm 1,4
- 2) GFP positiv, lebend: 8 % \pm 2,1
- 3) GFP positiv, tot: 3 % \pm 0,7 D. h. 25 % \pm 10,2 der infizierten Zellen sind 7AAD positiv bzw. tot.

spät

- 1) GFP positiv, gesamt: 14 % \pm 3,2
- 2) GFP positiv, lebend: 10 % \pm 3,7
- 3) GFP positiv, tot: 5 % \pm 1,6 D. h. 33 % \pm 14,5 der infizierten Zellen sind tot.

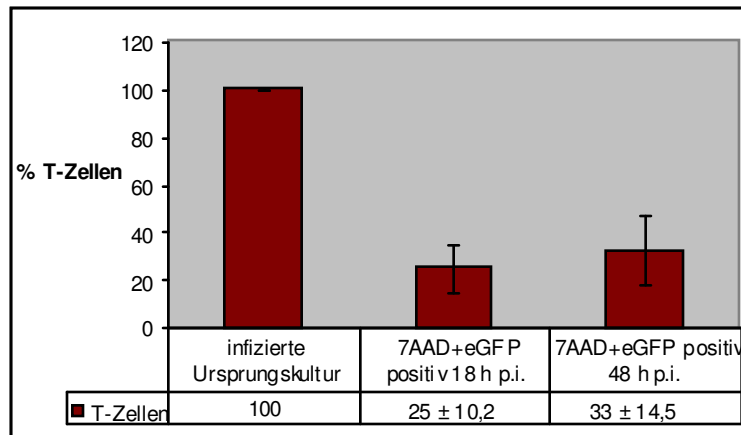


Abbildung 4.14: Graphische Darstellung der prozentualen Zusammensetzung von infizierten toten und lebenden T-Zellen aus der basolateralen Filterkammer

Infizierte Ursprungskultur (11 % früh/ 14 % spät) wurde gleich 100 % gesetzt (linker Balken). Von dieser Ursprungskultur sind 25 % 18 h p.i. und 33 % 48 h p.i. der infizierten T-Zellen 7AAD positiv (n= 3)

4.2.6 Transmigration von PBMCs durch Transwellfilter ohne EZ

Im nachfolgenden Experiment wurde analysiert, ob T-Zellen, die zuvor Kontakt mit UV-inaktiviertem Virus (dieselbe Menge Virus entsprechend MOI= 1) hatten, einen Unterschied im Transmigrationsverhalten durch die Transwellfilter mit Porengröße 8 µm ohne Endothelzellmonolayer im Vergleich zu uninfizierten Zellen zeigen. Die Experimente wurden im Dreifachansatz durchgeführt, d. h. mit PBMCs von 3 unterschiedlichen Spendern.

Abbildungen 4.15 und 4.16 zeigen das Ergebnis, dass das Transmigrationsverhalten sich nicht signifikant ändert, wenn die T-Zellen zuvor mit UV-inaktiviertem Virus behandelt worden sind.

Im nächsten Schritt erfolgte die Durchführung des Transmigrationsversuches mit rM_{IC323eGFP} MOI= 1 infizierten PBMCs.

Ersichtlich aus den Abbildungen 4.15, 4.16 und 4.17 ist festzustellen, dass im Vergleich zu uninfizierten T-Zellen weniger infizierte T-Zellen durch die Transwellfilter ohne einen daraufliegenden Endothelzellmonolayer wandern. Das Ergebnis ist jedoch statistisch nicht signifikant.

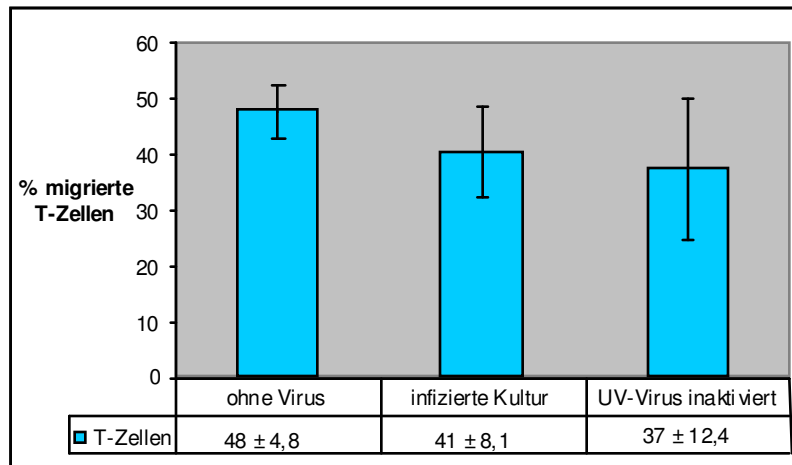


Abbildung 4.15: Graphische Darstellung aller transmigrierter T-Zellen der infizierten Kultur in % zum Zeitpunkt „früh“ ohne Endothelzellmonolayer

48 % an unbehandelten T-Zellen (linker hellblauer Balken) und 41 % an T-Zellen der infizierten Kultur (bestehend aus infizierten und uninfizierten T-Zellen, mittlerer hellblauer Balken) sind transmigriert (n= 3).

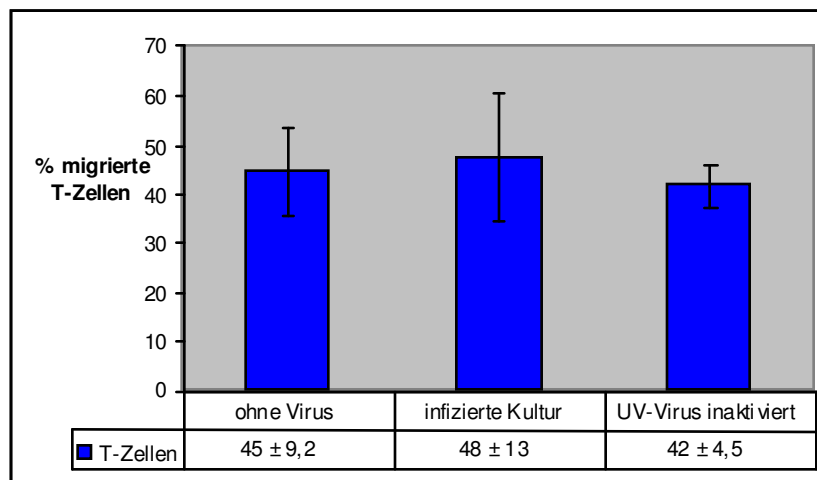


Abbildung 4.16: Graphische Darstellung aller transmigrierter T-Zellen der infizierten Kultur in % zum Zeitpunkt „spät“ ohne Endothelzellmonolayer

45 % an unbehandelten T-Zellen (linker blauer Balken) und 48 % an T-Zellen der infizierten Kultur (bestehend aus infizierten und uninfizierten T-Zellen, mittlerer blauer Balken) sind transmigriert (n= 3).

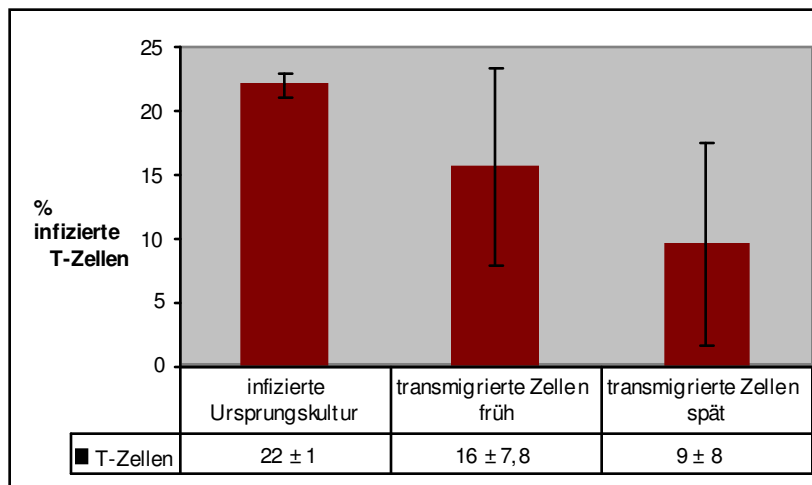


Abbildung 4.17: Graphische Darstellung des Prozentsatzes der infizierten T-Zellen von der Gesamtkultur und der transmigrierten T-Zellen ohne Endothelzellmonolayer

22 % der T-Zell aus der Kultur waren infiziert (linker schwarzer Balken). 16 % der „früh“ transmigrierten Zellen sind infiziert (mittlerer schwarzer Balken). 9 % der „spät“ transmigrierten T-Zellen sind infiziert (rechter schwarzer Balken) (n= 3).

4.2.7 Transmigration von PBMCs durch Tranwellfilter mit EC

Um die Fähigkeit von mit rMV_{IC323&GFP} MOI= 1 infizierten T-Zellen, durch endotheliale Barrieren zu wandern, zu untersuchen, wurden Transwellfilter eingesetzt, worauf zuvor humane mikrovaskuläre Gehirnendothelzellen kultiviert worden waren. Nach Überprüfung der Dichtigkeit der HBMECs mit FITC-Dextran, der Konfluenz durch Nachweise des ZO-1 Proteins und der Polarisierung durch Nachweise der unterschiedlichen Proteine auf der apikalen und basolateralen Seite im Westem-Blot konnte bei den T-Zellen aufgrund der MV-Infektion eine starke Hemmung der Fähigkeit, durch die HBMECs hindurchzuwandern, beobachtet werden.

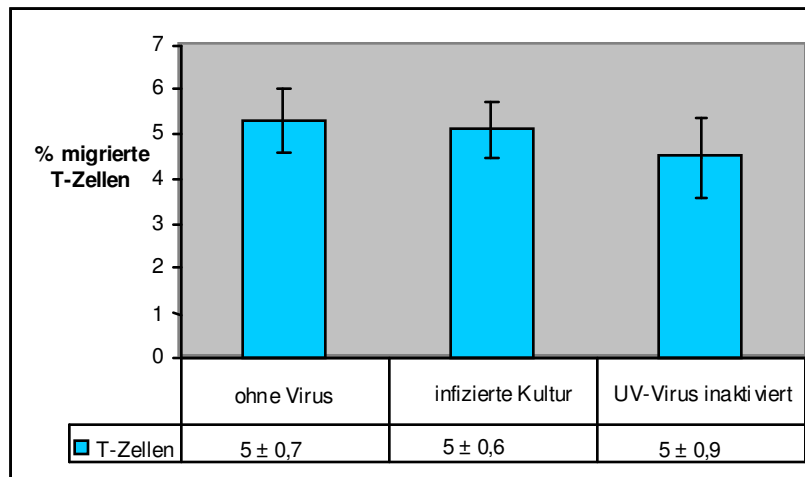


Abbildung 4.18: Graphische Darstellung aller transmigrierter T-Zellen in % zum Zeitpunkt „früh“ mit Endothelzellmonolayer

5 % an unbehandelten T-Zellen (linker hellblauer Balken) und 5 % an T-Zellen der infizierten Kultur (bestehend aus infizierten und uninfizierten T-Zellen, rechter hellblauer Balken) und 5 % an T-Zellen, die zuvor mit UV-inaktiviertem Virus behandelt worden sind, sind transmigriert (n= 3).

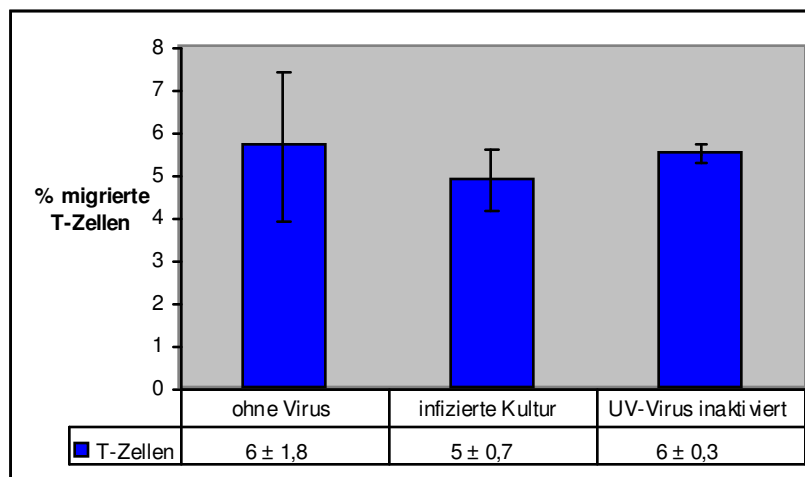


Abbildung 4.19: Graphische Darstellung aller transmigrierter T-Zellen in % zum Zeitpunkt „spät“ mit Endothelzellmonolayer

6 % an unbehandelten T-Zellen (linker blauer Balken), 5 % an T-Zellen der infizierten Kultur (bestehend aus infizierten und uninfizierten T-Zellen, rechter blauer Balken) und 6 % an T-Zellen, die zuvor mit UV-inaktiviertem Virus behandelt worden sind, sind transmigriert (n= 3).

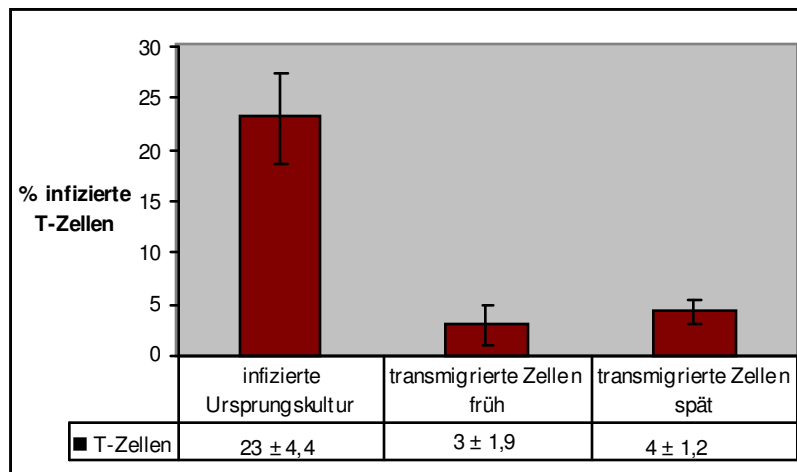


Abbildung 4.20: Graphische Darstellung des Prozentsatzes infizierter T-Zellen von der Gesamtkultur und transmigrierter infizierter T-Zellen mit Endothelzellmonolayer

23 % der T-Zellen der Kultur waren infiziert (linker schwarzer Balken). 3,0 % der „früh“ transmigrierten T-Zellen sind infiziert (mittlerer schwarzer Balken). 4 % der „spät“ transmigrierten T-Zellen sind infiziert (rechter schwarzer Balken) (n= 3).

Zusammenfassend kann man feststellen, dass die T-Zell-Migration durch die Filter nur geringfügig durch die MV-Infektion beeinträchtigt wurde, wohingegen die Transmigration durch den Endothelzellmonolayer signifikant gehemmt wurde.

4.3 Adhäsion von infizierten Leukozyten an Endothelzellen

4.3.1 Berechnung der adhärennten uninfizierten und infizierten T-Zellen aus den Transmigrationsversuchen

Die ersten Hinweise, dass die Adhäsion der PBMCs auf die Endothelzellen durch die MV Infektion erhöht sein könnte, ergaben sich aus den Transmigrationsversuchen. Als die PBMCs mit den Endothelzellen 16 h im Experiment „früh“ oder „spät“ inkubiert wurden, blieb die Mehrheit der Leukozyten adhärennt und konnte nicht mehr abgewaschen werden. Die absolute Anzahl an T-Zellen, die an dem Endothelzellmonolayer adhärennt, ließ sich

durch Subtraktion der absoluten Anzahl an abgewaschenen (apikal) und transmigrierten T-Zellen (basolateral) von der Anzahl an eingesetzten T-Zellen berechnen.

Beispielrechnung für die Ermittlung der adhärnten infizierten T-Zellen:

PBMC Kultur enthält 78 % T-Zellen, davon waren 22 % infiziert.

D. h. dass von 788.100 (insgesamt sind 1×10^6 PBMCs pipettiert worden) waren 171.491 T-Zellen infiziert. Ergab die FACS-Analyse, dass 5.940 infizierte T-Zellen im apikalen Medium verblieben sind und im basolateralen 358 T-Zellen, adhärnten ca. 165.193 T-Zellen auf dem Endothelzellmonolayer. Die Anzahl an toten T-Zellen wurde dabei vernachlässigt. Das bedeutet:

$$171.491 : 100 \% = 165.193 : x$$

$x = 96 \%$ der eingesetzten infizierten T-Zellen adhärnten an dem EZ-Monolayer.

Analog erfolgt die Rechnung für die Ermittlung der adhärnten uninfizierten T-Zellen.

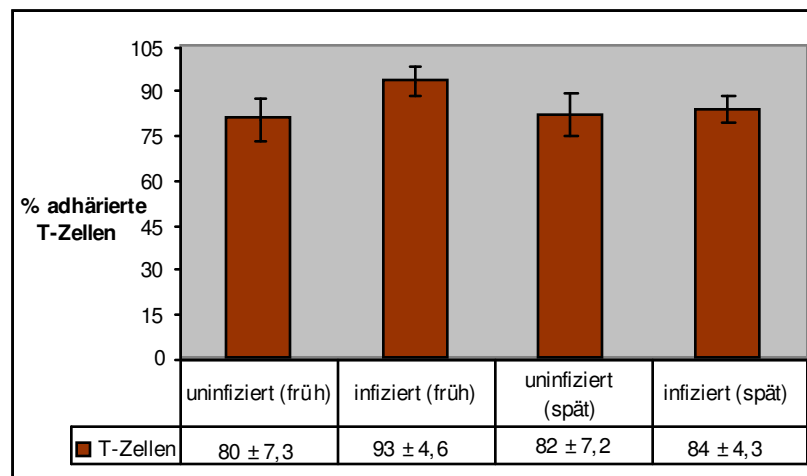


Abbildung 4.21: Darstellung der adhärnten T-Zellen aus uninfizierter und infizierter Kultur

80 % der früh und 82 % der spät transmigrierten T-Zellen der uninfizierten Kultur sind am Endothelzellmonolayer adhärnt geblieben. Im Gegensatz dazu blieben von der infizierten Kultur 93 % der früh und 84 % der spät transmigrierten T-Zellen adhärnt ($n = 3$).

In Folge der Infektion der Kultur wurde ein Anstieg der Adhäsion von T-Zellen von 80 auf 93 % („früh“) und 80 auf 85 % („spät“) detektiert.

4.3.2 Untersuchung des Adhäsionsverhaltens von infizierten PBMCs

Um die Adhäsion der Leukozyten und die beteiligten Adhäsionsmoleküle genauer zu analysieren und zu quantifizieren, wurde ein spezifischer Adhäsionstest durchgeführt. Dabei wurden den mit R18 (Excitationswellenlänge= 560 nm, Emissionswellenlänge= 590 nm) gefärbten Leukozyten 1 Stunde Zeit gelassen an die Endothelzellen (HBMECs) zu adhären. Im Fluorometer wurden die Fluoreszenzintensitäten der mit R18 gefärbten Leukozyten als Maß für die Adhäsion gemessen. Der Versuch ergab, dass mit rMV_{IC323eGFP} (MOI= 1) infizierte T-Zellen stärker adhärten (nach 24 h p.i. 111 % und nach 48 h p.i. 132 %) als uninfizierte (100 %) (siehe Abb. 4.23). Vor und während der Transmigration wird die Adhäsion zwischen den Leukozyten und den Endothelzellen durch die Integrine LFA-1 (CD11a/ CD18) und VLA-4 (CD49d/ CD29) auf den Leukozyten und durch ICAM-1 und VCAM-1 auf den Endothelzellen vermittelt. Um die Spezifität der beobachteten Adhäsion zu analysieren, wurden inhibierende Antikörper gegen diese Moleküle eingesetzt. Die Antikörper gegen CD18 und CD29 haben die Adhäsion von uninfizierten Leukozyten um 67 % und die Adhäsion von infizierten um 36 % nach 24 h p.i. und 52 % nach 48 h p.i. blockiert. Die Antikörper gegen ICAM-1 (wird auf den Leukozyten und den Endothelzellen exprimiert) und VCAM-1 inhibierten die Adhäsion der uninfizierten Leukozyten um 64 % und bei den infizierten um 32 % nach 24 h p.i. und 44 % nach 48 h p.i.

A	ohne Infektion	24 h p.i.	48 h p.i.
	13573	15048	16259
	12640	14433	16885
	13100	14082	18792
Mittelwert	13104	14521	17312
Stabw	466	434	1319

B	CD18/ CD29	24 h p.i. CD18/29	48 h p.i. CD18/29
	4324	11698	9049
	4062	6897	7814
	4455	9238	8255
Mittelwert	4280	9278	8373
Stabw	200	2400	625

C	I + V	24 h p.i. I + V	48 h p.i. I + V
	4324	10186	10231
	4717	9831	9236
	5111	9894	9566
Mittelwert	4717	9970	9678
Stabw	393	189	506

Tabelle 4.2: Messwerte der Fluoreszenzintensitäten der mit R18 gefärbten Leukozyten

Angabe der Fluoreszenzeinheiten der mit R18 gefärbten PBMCs. (A) ohne Infektion, 24 h und 48 h nach Infektion, (B) mit Zugabe der CD18/CD29 inhibierenden Antikörper ohne Infektion, 24 h und 48 h nach Infektion der PBMCs mit rMV_{IC323eGFP} (C) mit Zugabe der ICAM/ VCAM inhibierenden Antikörper ohne Infektion, 24 h und 48 h nach Infektion der PBMCs rMV_{IC323eGFP}. Mit Angabe des Mittelwertes und der Standardabweichung (Stabw).

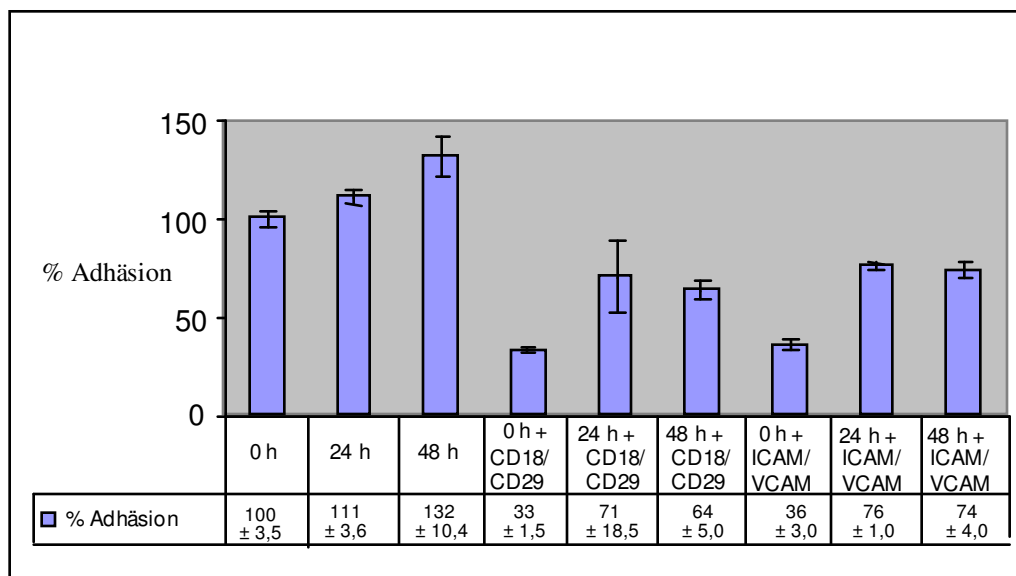


Abbildung 4.22: Graphische Darstellung der Adhäsion und Adhäsionshemmung der PBMCs in %
 Hellblaue Balken: Angabe der auf den Endothelzellen (HBMECs) adhären PBMCs in % ohne Zugabe von inhibierenden Antikörpern, mit Zugabe der inhibierenden Antikörper von CD18+CD29 bzw. ICAM-1+VCAM-1 zum Zeitpunkt 0 h, 24 h und 48 h nach Infektion der PBMCs mit rMV_{IC323eGFP} (n= 3).

Dieses Ergebnis bestätigte die Vermutung, dass die Infektion eine verstärkte Adhäsion von Leukozyten an die Endothelzellen verursacht.

4.4 Effekte der Infektion auf Adhäsionsrezeptoren

4.4.1 Untersuchung der LFA-1 und VLA-4 Expression

Um den Effekt der Infektion auf die Expression und die Aktivität von LFA-1 und VLA-4 zu untersuchen, wurden Antikörper benutzt, die entweder speziell die aktivierte Konformation dieser Integrine oder die von der Aktivierung unabhängigen Epitope erkennen. Zur Detektierung der LFA-1 und VLA-4 Expression wurden die Antikörper „anti-CD11a“, „anti-CD18“ und „anti-CD29“ verwendet. Als konformationspezifische Antikörper für die aktivierte Form von LFA-1 und VLA-4 haben wir die Klone NKI-L16 und HUTS-4 eingesetzt.

Zur Ermittlung der mittleren Fluoreszenzintensität (mFI) von mit $rMV_{IC323eGFP}$ MOI= 1 infizierten und uninfizierten T-Zellen wurde zuerst für die entsprechenden T-Zellen jeweils eine Region in einem Dot Plot angelegt (Abbildung 4.24 A), um sich dann die entsprechende Region der infizierten bzw. uninfizierten T-Zellen in einem Histogramm anzeigen zu lassen (Abbildung 4.24 B/C). Abbildung 4.24 zeigt ein Beispiel von der HUTS-4 Expression von T-Zellen.

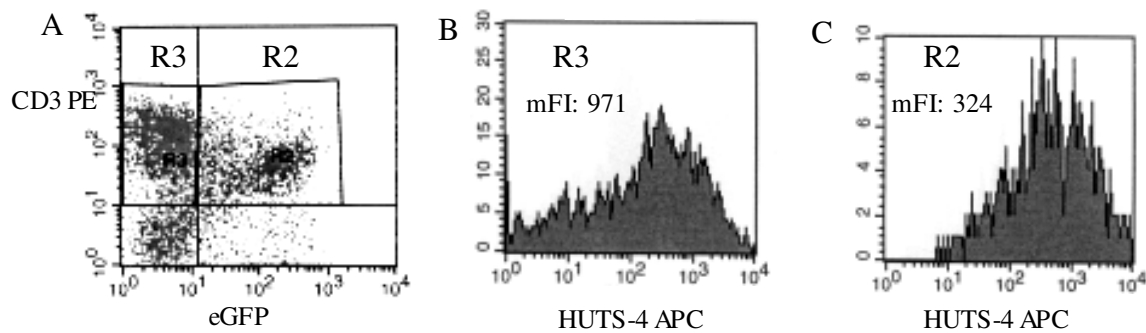


Abbildung 4.23: Durchflusszytometrische Darstellung von infizierten bzw. uninfizierten und HUTS-4 positiven T-Zellen

(A) z. B. R3= Region der uninfizierten d. h. eGFP-negativen T-Zellen, R2= Region der infizierten d. h. eGFP-positiven T-Zellen, (B) Histogrammische Darstellung der uninfizierten eGFP-negativen T-Zellen aus dem Region R3 und (C) Histogrammische Darstellung der infizierten eGFP-positiven T-Zellen aus dem Gate R2 in Abhängigkeit von der HUTS-4 Expression

Die FACS-Analysen ergaben, dass die aktivierte ausgestreckte Form der α -Kette von LFA-1 (NKI-L16 Epitop) weniger auf uninfizierten Kontroll-Kulturen als auf den 48 h infizierten T-Zellen exprimiert wurde (Abbildung 4.25, linkes Diagramm). Weitere Quantifizierungen des spezifischen NKI-L16 Epitops anhand der mittleren Fluoreszenzintensität ergaben, dass es durch die Infektion ca. um den Faktor 2,5 und 3,8 zum Zeitpunkt 24 h und 48 h nach Infektion stimuliert war, wohingegen das nicht-Aktivierungs-Epitop im Falle CD11a nur um den Faktor 1,6 und 2,2 bzw. bei CD18 um 2 und 3 der Fall war. Somit war, vermittelt durch die Infektion, die Expression von der aktivierten Form von LFA-1 höher. Ein noch größerer Unterschied stellte sich für VLA-4 von uninfizierten und infizierten Leukozyten heraus. Die aktivierte Form von VLA-4, d. h. HUTS-4 positive T-Zellen, wurde durch die MV-Infektion stark induziert. Die mittlere Fluoreszenzintensität stieg um den Faktor von ca. 20 und 18 nach 24 und 48 h nach Infektion, wohingegen das Signal für das aktivierungsunabhängige Epitop um den Faktor 13 und 14 anstieg. Diese Unterschiede zwischen den aktivierungsabhängigen und aktivierungsunabhängigen VLA-4 Epitopen war statistisch signifikant zum Zeitpunkt 24 h p.i. und nicht signifikant 48 h p.i.

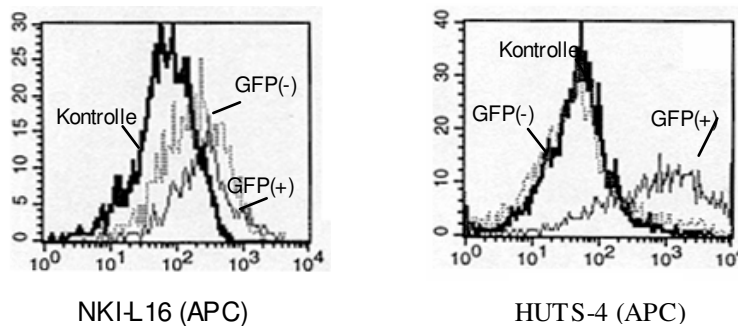


Abbildung 4.24: Zytometrische Darstellung der NKI-L16 und HUTS-4 positiven T-Zellen

Fettgedruckte schwarze Linie: Kontrolle, d. h. ohne NKI-L16 bzw. HUTS-4 Antikörper Zugabe.

Dünne schwarze Linie: uninfizierte eGFP-negative T-Zellen. Graue dünne Linie: infizierte eGFP-positive T-Zellen.

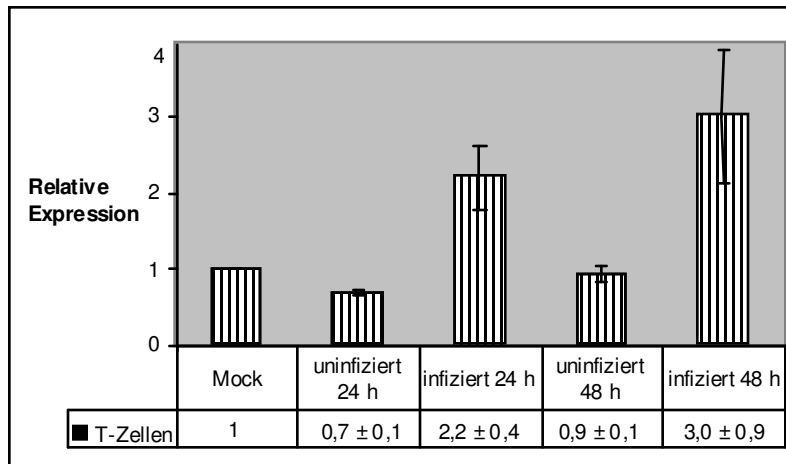


Abbildung 4.25: Graphische Darstellung der LFA-1 (CD18) Expression von T-Zellen

Im Vergleich zur Mockkontrolle stieg die CD18 Expression der T-Zellen der infizierten Kultur um den Faktor 2,2 nach 24 h p. i. bzw. 3 nach 48 h p. i. an (n= 3).

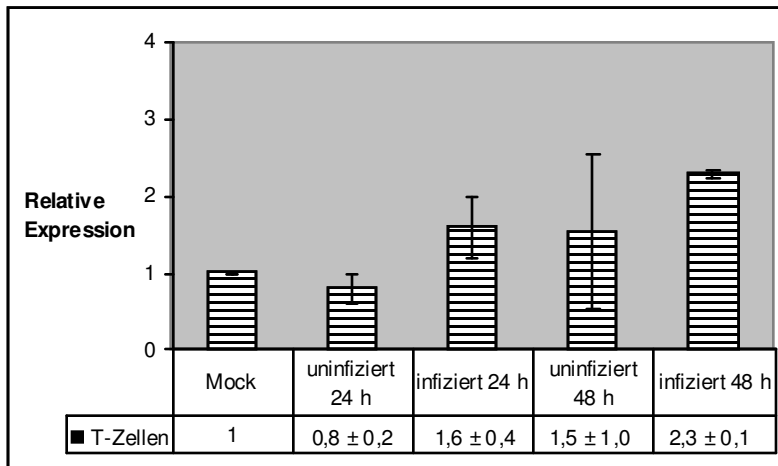


Abbildung 4.26: Graphische Darstellung der LFA-1 Expression (CD11a) von T-Zellen

Im Vergleich zur Mockkontrolle stieg die CD11a Expression von T-Zellen der infizierten Kultur um den Faktor 1,6 nach 24 h p. i. bzw. 2,3 nach 48 h p. i. an (n= 3).

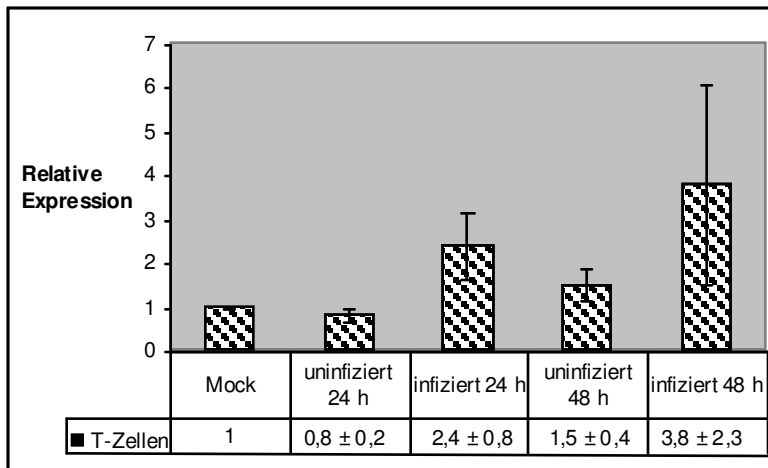


Abbildung 4.27: Graphische Darstellung der LFA-1 (NK1-L16) Expression von T-Zellen

Im Vergleich zur Mockkontrolle stieg die NK1-L16 Expression der T-Zellen der infizierten Kultur um den Faktor 2,4 nach 24 h p. i. bzw. 3,8 nach 48 h p. i. an (n= 3).

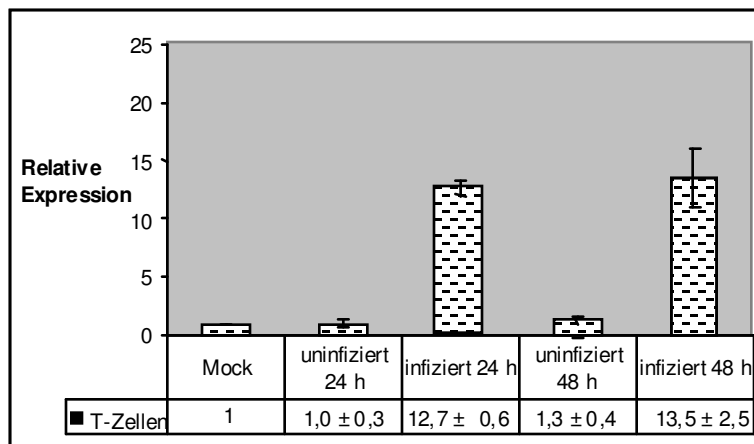


Abbildung 4.28: Graphische Darstellung der VLA-4 (CD29) Expression von T-Zellen

Verglichen mit der Mockkontrolle stieg die CD29 Expression der T-Zellen der infizierten Kultur um den Faktor 12,7 nach 24 h p. i. bzw. 13,5 nach 48 h p. i. an (n= 3).

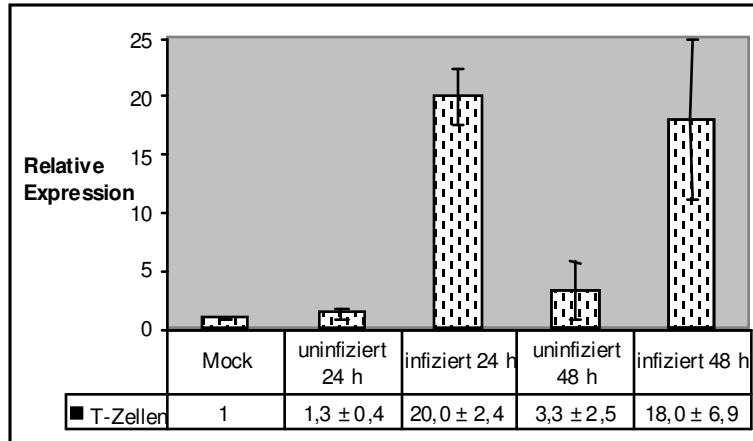


Abbildung 4.29: Graphische Darstellung der VLA-4 (HUTS-4) Expression von T-Zellen

Verglichen mit der Mockkontrolle stieg die HUTS-4 Expression der T-Zellen der infizierten Kultur um den Faktor 20 nach 24 h p. i. bzw. 18 nach 48 h p. i. an (n= 3).

Zusammenfassend deuten diese Daten darauf hin, dass die MV-Infektion die Expression und die Aktivität von den Adhäsionsmolekülen LFA-1 und VLA-4 auf T-Zellen stimuliert und dass diese Moleküle die verstärkte Adhäsion von infizierten T-Zellen auf Endothelzellen vermitteln.

4.4.2 Messung der CCR1/CCR2 und CCR5 Expression

Bei den Transmigrationsversuchen wurden zum Aufbau eines Chemokingradienten die Chemokine Rantes und MCP-1 (5ng/ml) dem basolateralen Medium hinzugefügt. Die biologische Wirkung von Chemokinen wird über sogenannte Chemokinrezeptoren (CCR) vermittelt, die über sieben Transmembrandomänen verfügen und intrazellulär an G-Proteine gekoppelt sind. Diese Bindung aktiviert den Rezeptor und löst eine Wanderung der Zellen aus, die sich in Richtung der höchsten Chemokinkonzentration bewegen (Chemotaxis). Der zu dem Chemokinrezeptor CCR1 und CCR5 dazugehörige Ligand ist Rantes und zu CCR2 MCP-1.

In diesem Zusammenhang wurde untersucht, ob die MV-Infektion einen Effekt auf die Expression der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 hat. Dazu wurden die PBMCs mit rMV_{IC323&GFP} MOI= 1 infiziert. Nach Inkubation mit anti-CD3-PE-Antikörper,

zur Identifizierung der T-Zellen, und spezifischen Antikörper gegen CCR1/2/5-APC wurde die CCR Expression nach 24 h p.i. und 48 h p.i. im FACS gemessen.

Die Auswertung erfolgte, wie bereits unter 4.4.1 beschrieben, durch Messung der Fluoreszenzintensität der infizierten T-Zellen. Die Ergebnisse der CCR-Expressionsmessung sind in Abbildung 4.30, 4.31 und 4.32 dargestellt.

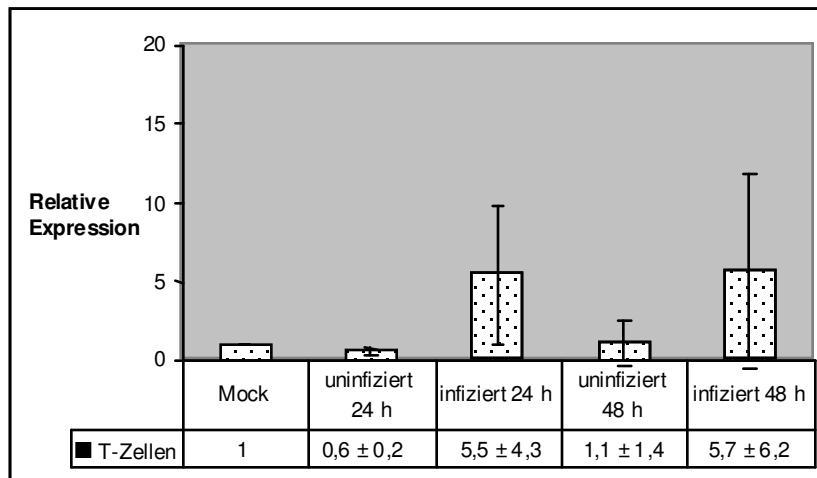


Abbildung 4.30: Graphische Darstellung der CCR1 Expression auf T-Zellen

Verglichen mit der Mockkontrolle stieg die CCR1 Expression der T-Zellen der infizierten Kultur um den Faktor 5,5 nach 24 h p. i. bzw. 5,7 nach 48 h p. i. an (n= 3).

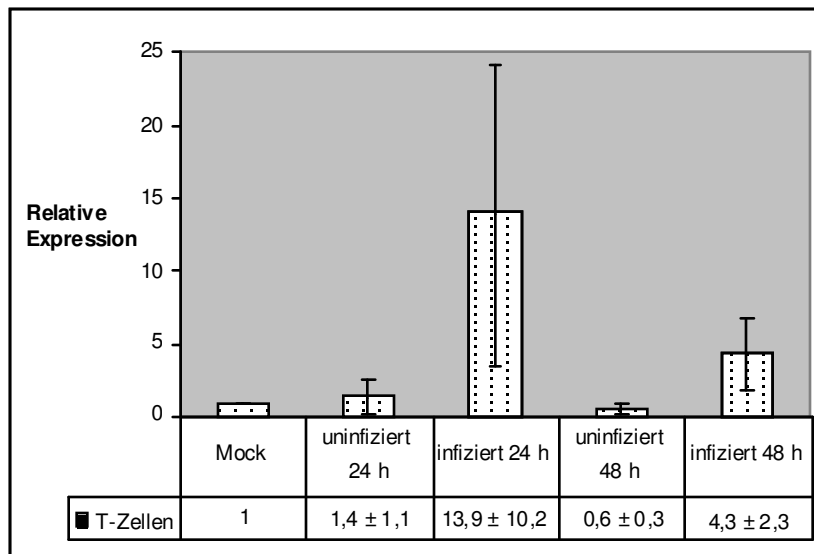


Abbildung 4.31: Graphische Darstellung der CCR2 Expression auf T-Zellen

Verglichen mit der Mockkontrolle stieg die CCR2 Expression der T-Zellen der infizierten Kultur um den Faktor 14 nach 24 h p. i. bzw. 4,3 nach 48 h p. i. an (n= 3).

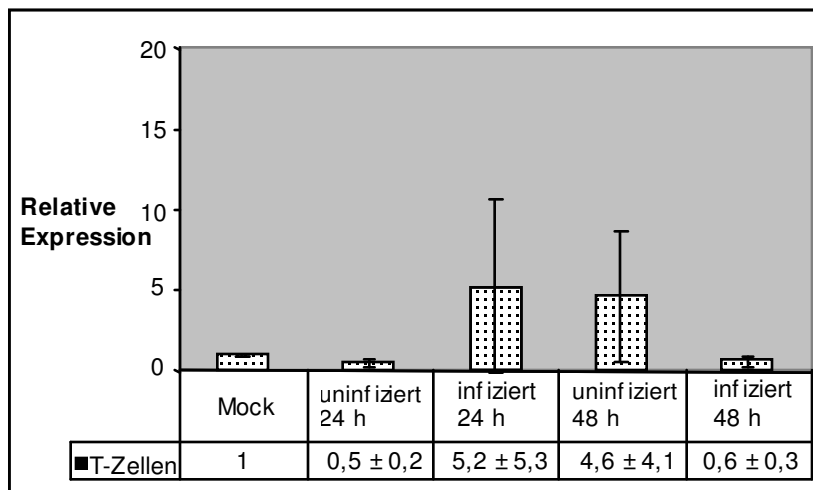


Abbildung 4.32: Graphische Darstellung der CCR5 Expression auf T-Zellen

Verglichen mit der Mockkontrolle Anstieg der CCR5 Expression auf T-Zellen um den Faktor 5 bei 24 h und 48 h infizierten T-Zellen (n= 3).

Die Expression von CCR1/CCR2/CCR5 der T-Zellen der infizierten Kultur ist erhöht, jedoch ist das Ergebnis statistisch nicht signifikant.

4.5 Ausbildung von „transmigratory cups“ (docking-Struktur) bei Kontakt eines Leukozyten mit einer Endothelzelle

Sogenannte „transmigratory cups“, auch docking-Struktur genannt, bilden sich aus, wenn die Endothelzellen adhären Leukozyten mit membranartigen Ausstülpungen im ersten Schritt der transzellulären oder intrazellulären Migration umschließen. Für diese Experimente wurden die Endothelzellen mit den Leukozyten für 24 h überschichtet. Zum Nachweis dieser docking-Struktur wurde gegen ICAM-1 bzw. VCAM-1 gefärbt. Zur Visualisierung diente der sekundäre Antikörper Alexa®594.

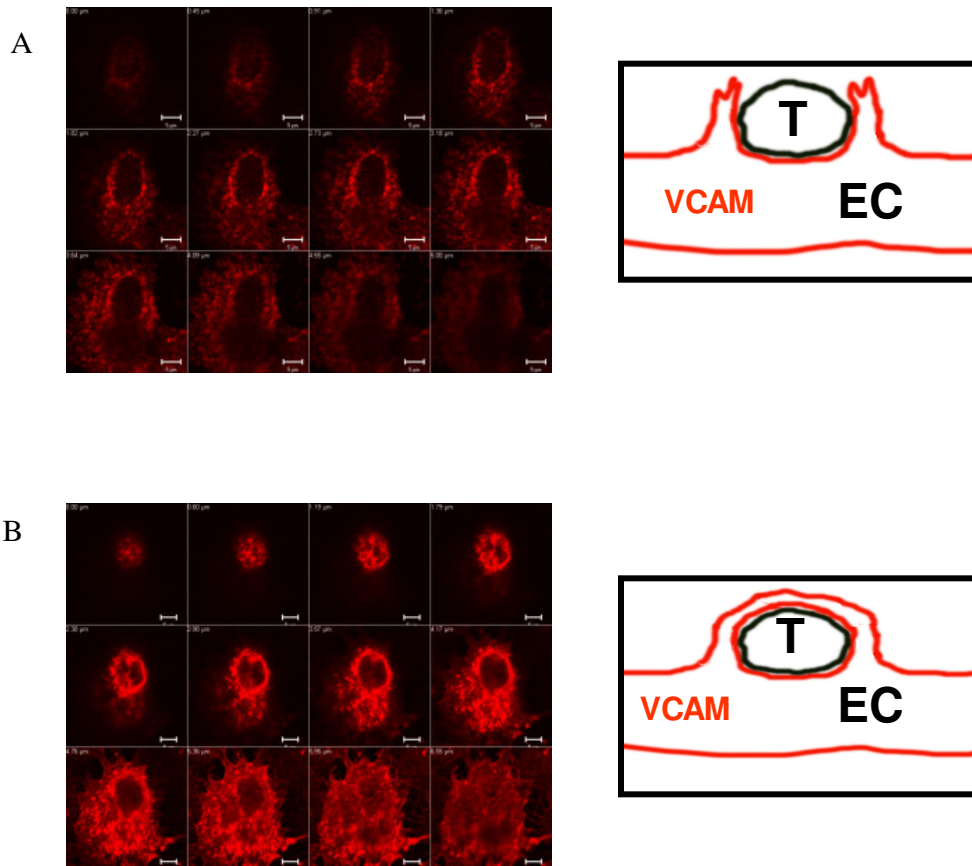


Abbildung 4.33 Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einer docking-Struktur

Zu sehen sind fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von uninfizierten HUVECs und einer adhären T-Zelle. Es wurde gegen VCAM gefärbt mit Alexa@594 als Sekundärantikörper. (A/B) Abgebildet ist ein Z-Stack von einer docking-Struktur beginnend am Objektträger bis hin zum Deckglas (A) Membranausstülpungen der Endothelzellen umfassen die T-Zelle, d. h. die Transmigration der T-Zelle durch die Endothelzelle wird damit eingeleitet. (B) Die T-Zelle wird komplett von der Membran der Endothelzelle umfásst.

4.5.1 Ausbildung von „transmigratory cups“ zwischen MV-infizierten T-Zellen und Endothelzellen

Nachdem in der Immunfluoreszenz gezeigt werden konnte, dass sich mit den HUVECs und den Leukozyten docking-Strukturen ausbilden, beschäftigten wir uns mit der Frage, ob sich normale „transmigratory cups“ auch mit infizierten Leukozyten ausbilden können. Dazu wurden Endothelzellen mit rMV_{IC323eGFP} (MOI= 1) infizierten Leukozyten für 24 h überschichtet. Wie in Abbildung 4.34 und 4.35 zu sehen ist, bildeten sich ganz normale „Transmigratory cups“ aus, obwohl die Leukozyten infiziert waren.

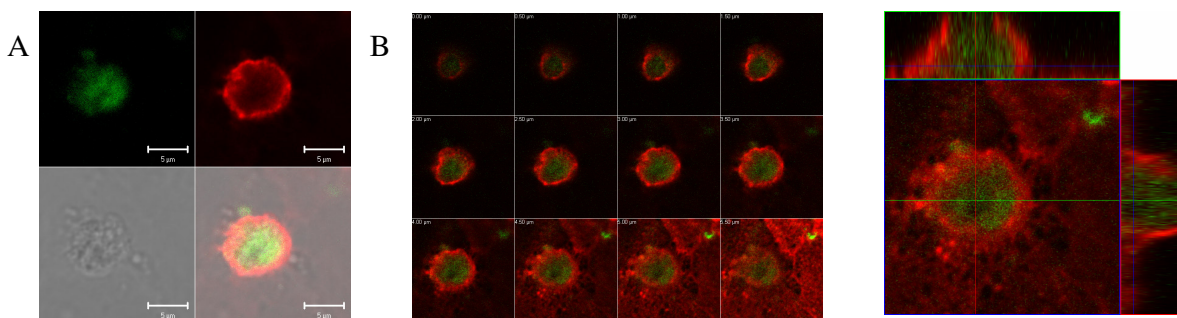


Abbildung 4.34: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einer docking-Struktur mit einer infizierten T-Zelle

(A) Obere Reihe: einfache Fluoreszenz, grün= eGFP und rote Färbung von ICAM-1 mit Alexa®594, untere Reihe von links nach rechts: Phasenkontrast einer T-Zellen und Überlagerung der grünen und roten Fluoreszenz; (B) Z-Stack von einer docking-Struktur beginnend vom Objektträger bis hin zum Deckglas; (C) Vergrößerung einer Ebene aus dem Z-Stack, zu sehen ist eine geöffnete docking-Struktur. Maßstab: 5µm

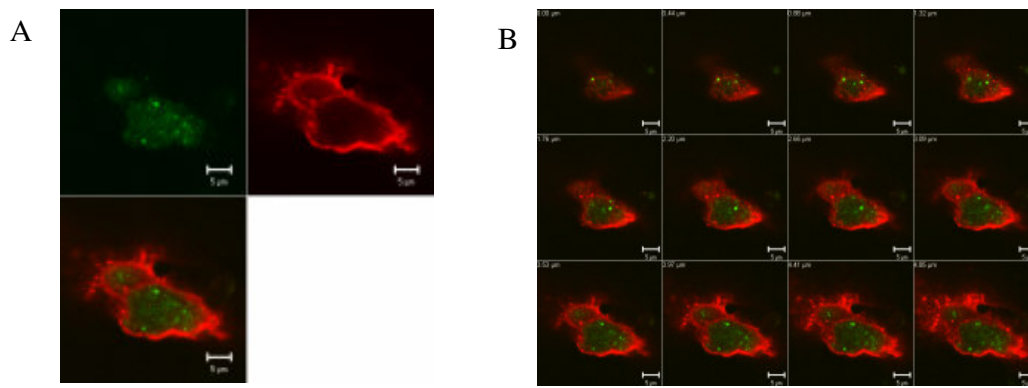


Abbildung 4.35: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme einer „Doppel-docking-Struktur“

(A) Doppel-docking-Struktur bestehend aus einem Monozyt und einer T-Zelle. Grün= eGFP, rote Färbung von ICAM mit Alexa@594, Überlagerung beider Fluoreszenzen. (B) Z-Stack der doppel-docking-Struktur beginnend am Objektträger bis hin zum Deckglas.

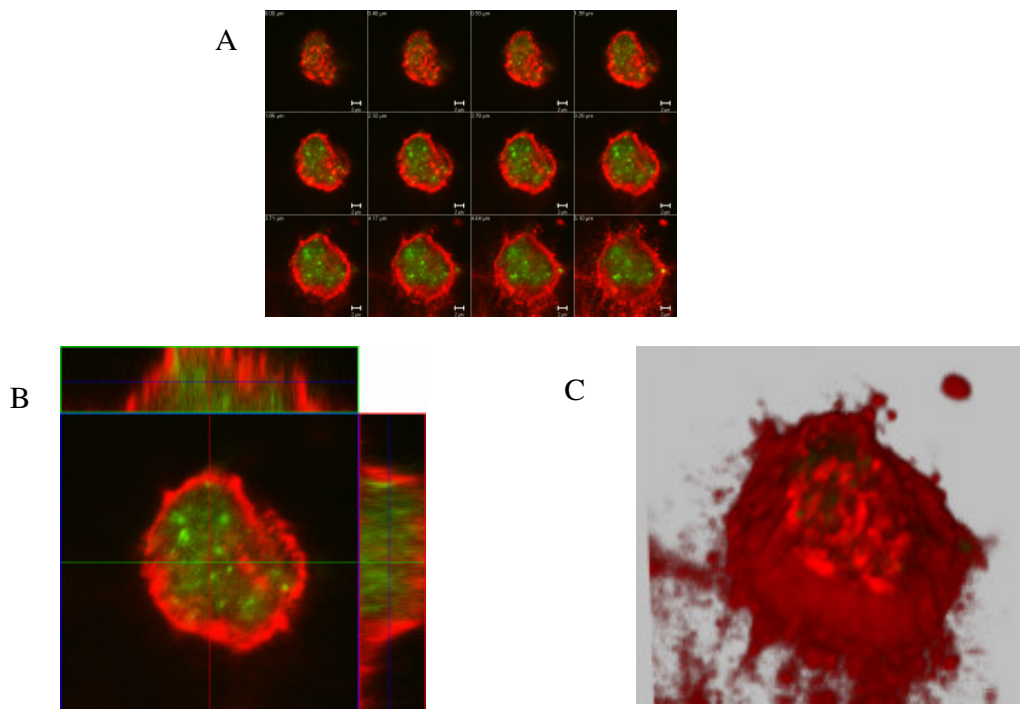


Abbildung 4.36: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einer docking-Struktur mit einer infizierten T-Zelle

Grün= eGFP und rote Färbung von VCAM-1 mit Alexa@594 (A) Z-Stack von einem „transmigratory cup“ beginnend vom Objektträger bis hin zum Deckglas; (B) Vergrößerung einer Ebene aus dem Z-Stack, zu sehen ist eine geschlossene docking-Struktur. (C) Dreidimensionale Darstellung einer geschlossenen docking-Struktur Maßstab: 5µm

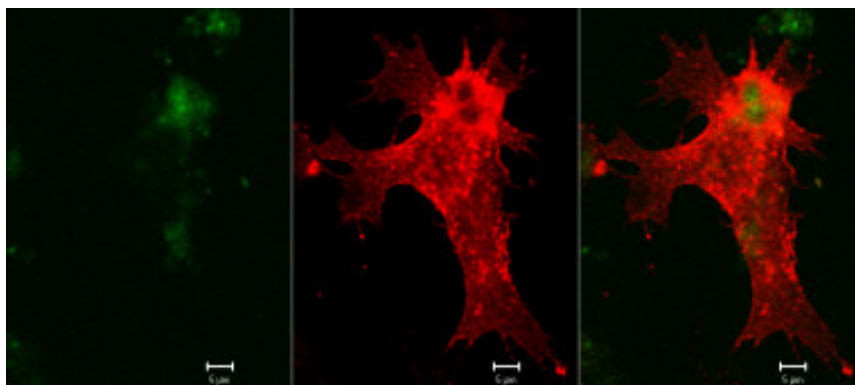


Abbildung 4.37: Fluoreszenz mikroskopische Aufnahme einer HUVEC-Zelle mit docking- Struktur
Linkes Bild: grüne Fluoreszenz, d. h. die Zelle ist eGFP positiv und somit infiziert, mittleres Bild: rote Fluoreszenz, Färbung von VCAM mit Alexa@594; rechtes Bild: Überlagerung der beiden Fluoreszenzen; Maßstab: 5µm.

4.5.2 Doppelfärbung mit LFA-1 bzw. VLA-4 und ICAM-1 bzw. VCAM-1

Der Versuch wurde unter den selben Bedingungen wiederholt. In der Immunfluoreszenz wurden neben ICAM-1 bzw. VCAM-1 die Adhäsionsmoleküle LFA-1 bzw. VLA-4 auf den Leukozyten angefärbt. Als primäre Antikörper wurden biotinylierte Antikörper gegen ICAM-1 bzw. VCAM-1 eingesetzt und dementsprechend Streptavidin als „Sekundärantikörper“. Zur Färbung von LFA-1 bzw. VLA-4 wurden spezielle primäre gegen diese Adhäsionsmoleküle gerichtete primäre Antikörper und als Zweitantikörper Alexa@633, hier dargestellt in gelber und blauer Fluoreszenz, verwendet.

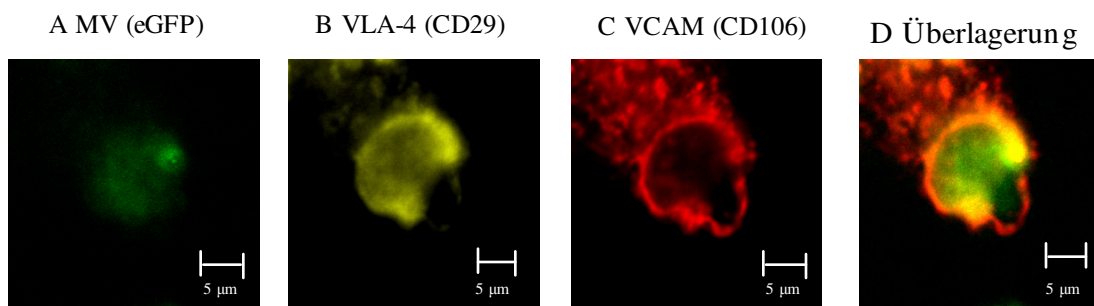


Abbildung 4.38: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von VCAM (rot) und CD29 (gelb)

Doppel färbung von VLA-4 (gelb, B) und VCAM (rot, C) auf einer GFP-positiven (grün, A) MV-infizierten T-Zelle in einer docking-Struktur. (D) Überlagerung der drei Fluoreszenzen

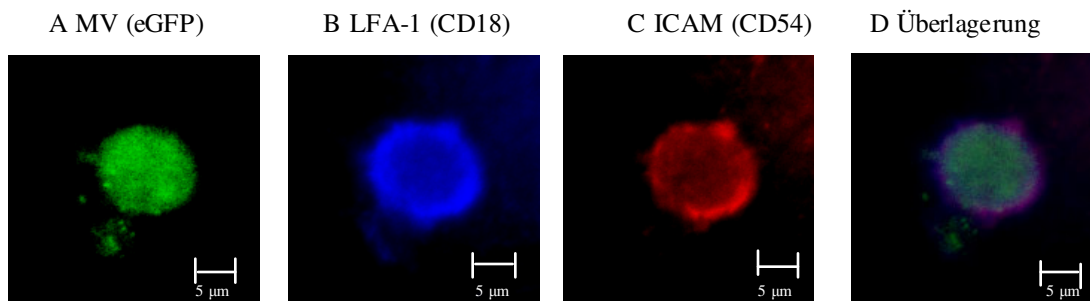


Abbildung 4.39: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von ICAM (rot) und CD18 (blau)

Doppel färbung von LFA-1 (blau, B) und ICAM (rot, C) auf einer eGFP-positiven (grün, A) MV-infizierten T-Zelle in einer docking-Struktur. (D) Überlagerung der drei Fluoreszenzen

4.6 Infektion von Endothelzellen nach Adhäsion von Leukozyten

Nachdem die mit $rMV_{IC323eGFP}$ (MOI= 1) infizierten PBMCs für ca. 6 Tage auf dem konfluenten Monolayer der Endothelzellen (HBMECs) überschichtet waren, stellten wir fest, dass die Infektion sich von den Leukozyten auf die Endothelzellen ausbreitete. Nach 1 h und 24 h lagen kleine runde eGFP positive Lymphozyten auf der Oberfläche des Endothellmonolayers. Im Verlauf der Zeit (innerhalb von 2 Tagen) erschienen große infizierte Endothelzellen. Während die Anzahl an infizierten Endothelzellen zunahm, konnten jedoch keine Synzytien beobachtet werden. Siehe dazu Abbildung 4.40.

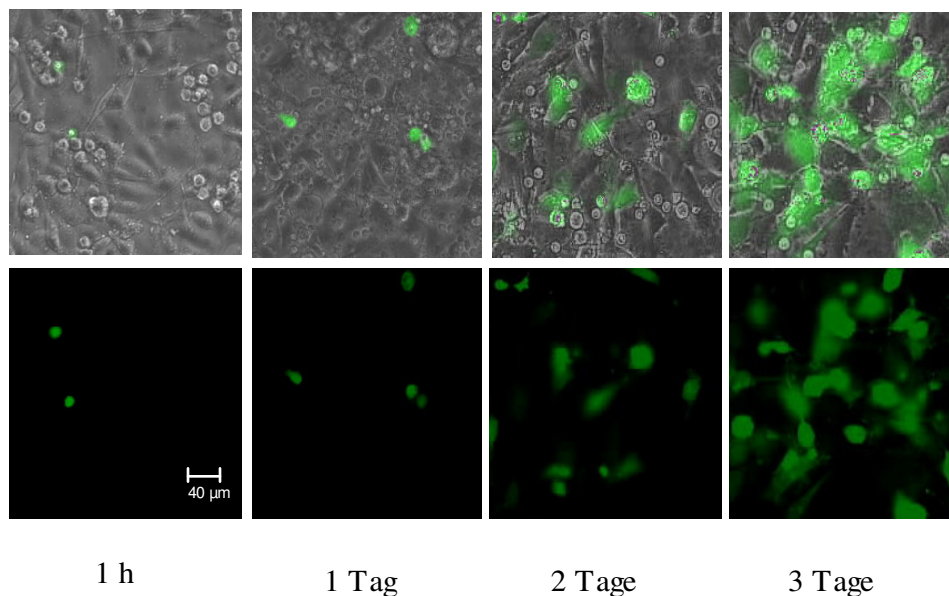


Abbildung 4.40: Phasenkontrastaufnahme eines Endothelzellmonolayers mit Überlagerung der grünen Fluoreszenz der infizierten Lymphozyten

Untere Reihe von links nach rechts: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von eGFP positiven Lymphozyten im Zeitraum von 1 h bis zu 3 Tagen; obere Reihe von links nach rechts: Die dazugehörigen Phasenkontrastaufnahmen von dem HBMEC Monolayer mit Überlagerung der grünen Fluoreszenz der infizierten Lymphozyten. Maßstab: 40 µm.

4.6.1 Weiterkultivierung der infizierten HBMECs

Die infizierten HBMECs wurden nach 3 - 5 Tagen vom Filter mit ATV abgelöst und in Zellkulturflaschen bei 37 °C mit 5 % CO₂ weiterkultiviert. Interessant war zu beobachten, dass die infizierten Endothelzellen sogenannte filiforme Ausläufer zu uninifizierten Zellen hin bildeten (siehe Pfeil in Abbildung 4.41).

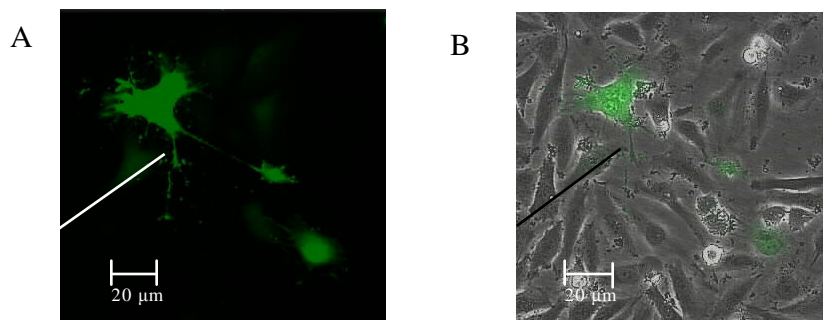


Abbildung 441: Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme von infizierten Endothelzellen

(A) Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von eGFP positiven infizierten Endothelzellen (HBMECs) mit ihren filiiformen Ausläufern bis hin zu uninfizierten Zellen (siehe Pfeile) mit beginnender eGFP Expression dieser Zellen. (B) Überlagerung der grünen Fluoreszenz mit der Phasenkontrastaufnahme des Endothelzellmonolayers.

4.6.2 ZO-1 Kontrolle von MV infizierten konfluenten HUVECs

Zur Überprüfung der Dichtigkeit des Monolayers mit infizierten HUVECs wurde das ZO-1 Protein der „tight junctions“ nachgewiesen. Die HUVECs wurden zuvor in Suspension mit dem an Endothelzellen adaptierten rMV_{IC323eGFP} mit einer MOI von 1 im Wasserbad bei 37 °C infiziert und danach auf Filtern ausgesät. Abbildung 4.43 zeigt einen konfluenten Monolayer von uninfizierten (A) und 48 h infizierten (B) HUVECs. Der Versuch zeigt anhand der ZO-1 Färbung, dass sich trotz Infektion der HUVECs „tight junctions“ ausbilden.

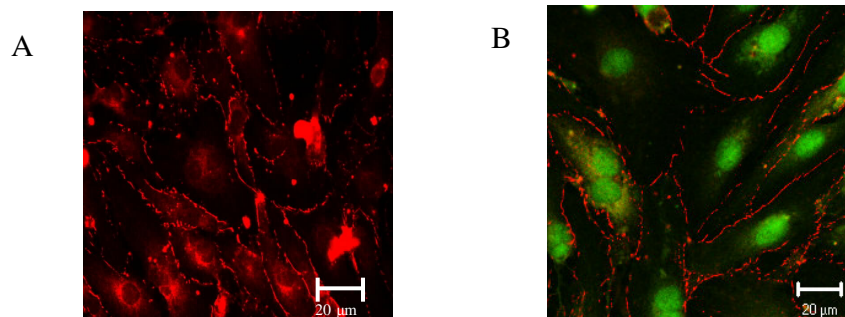


Abbildung 4.42: ZO-1 Färbung von infizierten HUVECs

Färbung der „tight junctions“ mit dem primären Antikörpern gegen das ZO-1 Protein mit Verwendung des sekundären Antikörpers Alexa-Fluor®594 (rot), (A) Uninfizierte HUVECs (B) EGFP positive HUVECs infiziert mit rMV_{IC323eGFP} MOI= 1, Maßstab: 20µm

4.7 Virusfreisetzung von polarisierten Endothelzellen

4.7.1 Untersuchung der gerichteten Hüllproteinexpression mittels Immunfluoreszenz

Um die Virusfreisetzung zu untersuchen, haben wir die Endothelzellen 3 Tage auf den Transwell-Filtern kultiviert, um einen konfluenten Monolayer zu erhalten. Die Polarisierung der Zellen wurde, wie bereits schon gezeigt (Kapitel 4.1.2), durch Nachweis der auf der apikalen und basolateralen Seite unterschiedlich vorhandenen Proteine mittels Western-Blot nachgewiesen. Die Endothelzellen wurden mit rMV_{IC323eGFP} mit einer MOI von 1 infiziert. Die Verteilung des H-Glykoproteins wurde mittels dem primären Antikörper K83 und dem sekundären Antikörper Alexa-Fluor®594 visualisiert. Die Auswertung erfolgte am konfokalen Mikroskop. Die Aufnahme eines Z-Stacks zeigte, dass MV-H-Proteine (rote Punkte) auf beiden Seiten, der apikalen und basolateralen, der polarisierten Endothelzelle exprimiert wurden.

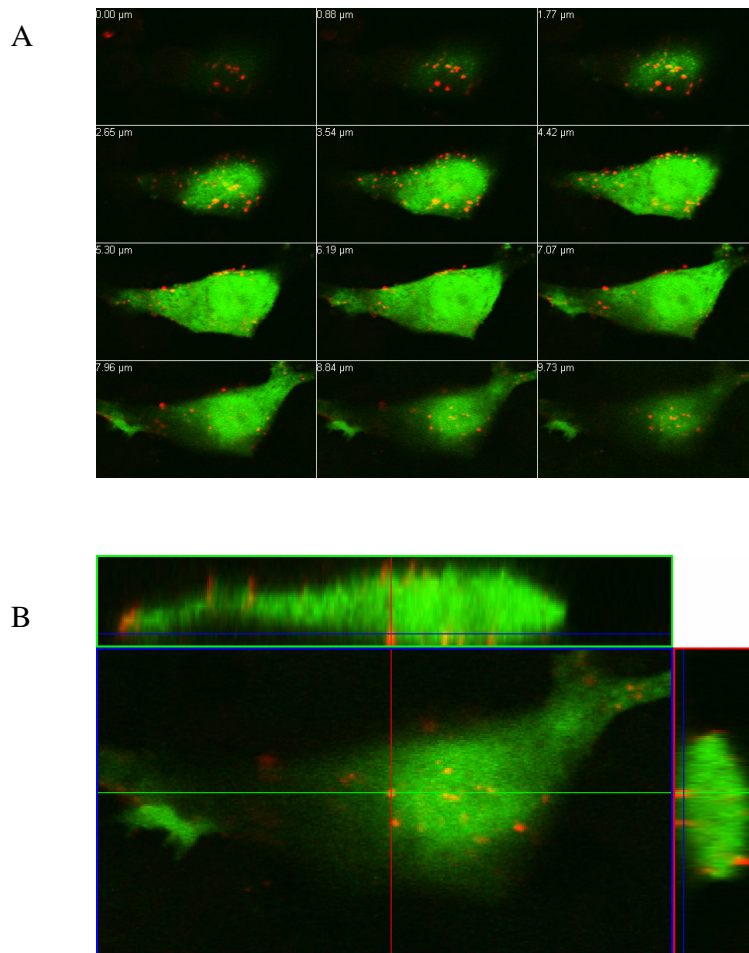


Abbildung 4.43: Apikale und basolaterale Verteilung des MV-H-Glykoproteins

(A) Abgebildet ist ein Z-Stack von einer mit rMV_{IC323}eGFP infizierten HBMEC Zelle beginnend vom Deckglas (oben links) bis hin zum Objektträger (unten rechts), (B) Gezeigt wird eine Ebene des Z-Stacks zum Zeitpunkt 48 h nach Infektion. **MV-H: rot, Infektion: eGFP**

4.7.2 Bestimmung der Virusfreisetzung mittels Plaque-Test

Die Analyse der Virusfreisetzung von mit dem an Endothelzellen adaptierten rMV_{IC323}eGFP MOI= 1 infizierten HBMECs mittels Titration der Mediumüberstände der oberen und unteren Filterkammer ergab, dass das Virus zu beiden Seiten freigesetzt wird, jedoch

geringfügiger zur basolateralen Seite (siehe dazu Abbildung 4.44).

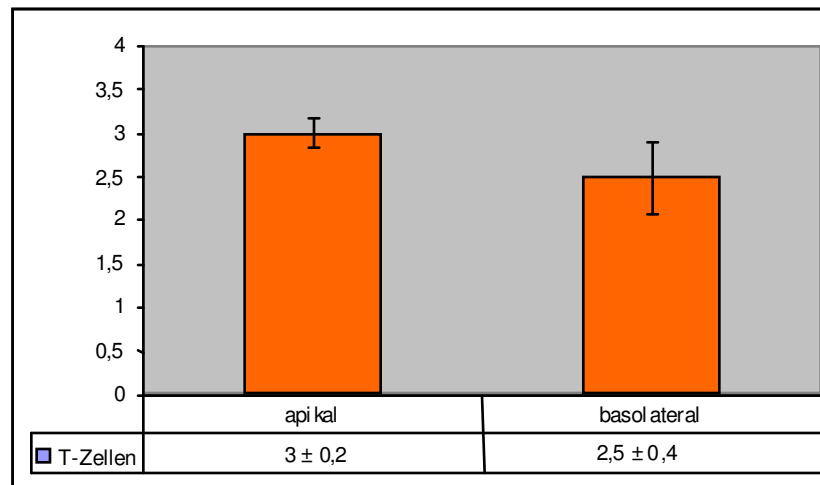


Abbildung 4.44: Graphische Darstellung der Virusfreisetzung von rMV_{IC323eGFP}infizierten HBMECs

Virusfreisetzung ins apikale und basolaterale Medium wurde quantifiziert durch Plaque Titration. Die apikalen und basolateralen Virustiter 48 h nach Infektion sind aufgeführt.

4.8 Einfluss der zytoplasmatischen Sortierungssignale auf die Expression der viralen Hüllproteine in Endothelzellen

4.8.1 Untersuchung der apikalen und basolateralen Verteilung der MV-H und MV-F-Glykoproteine mittels Immunpräzipitation

Wir beschäftigten uns mit der Frage, ob spezifische auf Tyrosin basierende basolaterale Sortierungssignale, die funktionell bei den Epithelzellen eine Rolle spielen, auch für die MV Ausbreitung in Endothelzellen verantwortlich sind. Für diesen Zweck setzten wir ein rekombinantes Virus ein, das den Rezeptor CD46 benutzt, und das Standardvirus MV_{EDM}. Das rekombinante Virus enthielt je eine Mutation in beiden zytoplasmatischen Transportsignalen (Tyrosin 549 im F- und Tyrosin 12 im H-Protein) der Hüllproteine

(Moll et al. 2004), um den basolateralen Transport der Glykoproteine auszuschalten.

A) MV_{Edm}

F_{Edm} ...RGRCNKKGEQVGMSRPGLKPDLTGTSKS **Y**VRS L
 H_{Edm} MSPQRDRINAF **Y**KDNPHPKGS RIVINREHLMIDR...

B) $rMV_{FHY/A}$

$F_{H12Y/A}$...RGRCNKKGEQVGMSRPG LKPDLTGTSKS **A**VRS L
 $H_{H12Y/A}$ MSPQRDRINAF **A**KDNPHPKGS RIVINREHLMIDR...

Abbildung 4.45: Aminosäuresequenz der F- und H-Proteine des Masernvirus

(A) Die zytoplasmatische AS-Sequenz der F- und H-Proteine des MV_{Edm} . (B) Durch Austausch von **Y** (Tyrosin) durch **A** (Alanin) in dieser AS-Sequenz entsteht das rekombinante Virus $rMV_{FHY/A}$.

Die Experimente wurden mit polarisierten HUVECs und EAhy926, einer Hybridzelllinie aus HUVECs und Epithelzellen, und unpolarisierten Verozellen als Kontrolle durchgeführt. Die Zellen wurden auf Transwellfiltern gezüchtet und entweder mit dem MV_{EDM} oder der Mutanten $rMV_{FHY/A}$ mit einer $MOI= 0,1$ infiziert. 48 h nach Infektion wurden die Zellen von der apikalen und basolateralen Seite biotinyliert, lysiert und die viralen Glykoproteine F und H mittels Antikörper gefällt. Nach Durchführung einer SDS-PAGE und blotten auf eine Nitrozellulosemembran wurden die biotinylierten Glykoproteine mit Streptavidin-Meerettich-Peroxidase detektiert. Bei den unpolarisierten Verozellen und polarisierten Endothelzellen, die mit MV_{EDM} infiziert worden waren, wurde das F- und das H-Protein auf beiden Seiten exprimiert, tendenziell auf der apikalen Seite jedoch etwas stärker (siehe dazu Abbildung 4.46 (A)). Bei den mit $rMV_{FHY/A}$ infizierten Verozellen wurden die mutierten Glykoproteine ebenfalls auf beiden Seiten exprimiert, wohingegen sie bei den polarisierten Endothelzellen nur auf der apikalen Seite präsent waren (siehe dazu Abbildung 4.47 (B)). Somit kann man feststellen, dass die intakten tyrosinhaltigen Signale in dem zytoplasmatischen Ende der MV Glykoproteine benötigt werden, um die Glykoproteine

H und F auf der basolateralen Membranseite von polarisierten Endothelzellen exprimieren zu können.

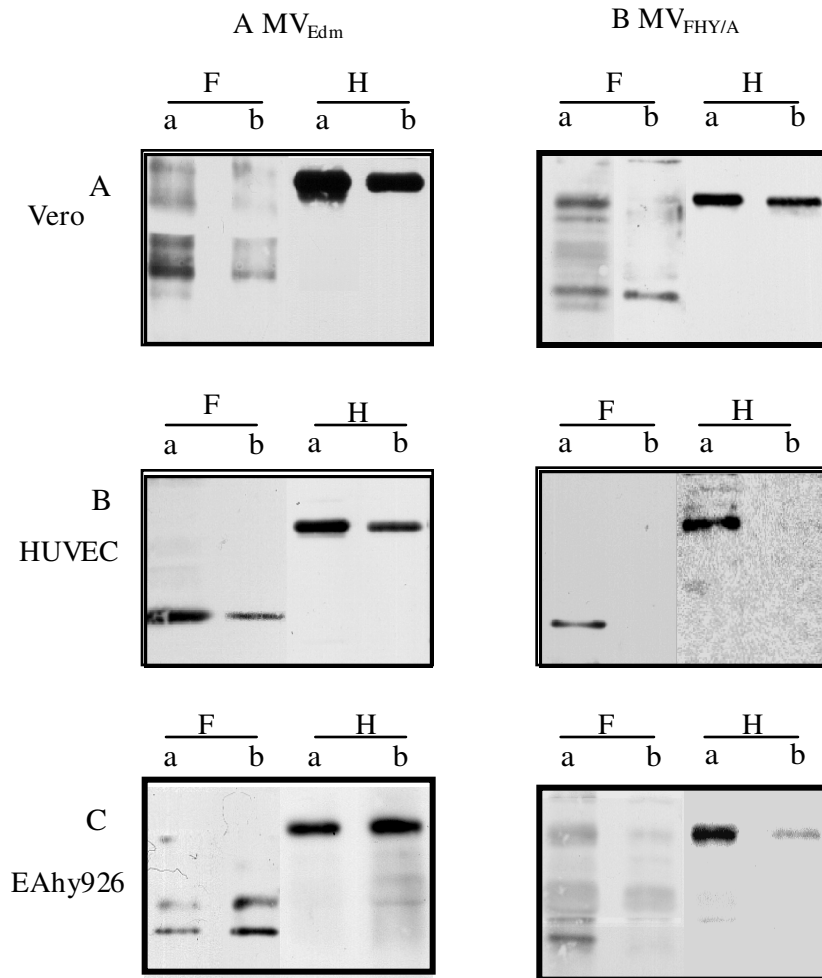


Abbildung 4.46: Apikale und basolaterale Verteilung der MV F- und H-Glykoproteine

Vero, HUVEC und EAhy926 Zellen wurden infiziert mit MV_{EDM} (A) und der Mutanten rMV_{FHYA} (B). 48 h p.i. wurde die apikale und basolaterale Seite in getrennten Ansätzen biotinyliert und die Glykoproteine H und F immunpräzipitiert.

4.8.2 Untersuchung der MV Freisetzung

Um diese Daten zu verifizieren, wurde die Virusfreisetzung gemessen. MV_{Edm} wurde überwiegend im apikalen Überstand nachgewiesen, aber auch geringe Mengen im basolateralen Überstand der Vero- und polarisierten Endothelzellen. Wie erwartet, war die Virusfreisetzung der Mutante $rMV_{FHY/A}$ von den unpolarisierten Verozellen bipolar. Im Gegensatz dazu wurde das mutierte Virus bei den polarisierten Endothelzellen nur auf der apikalen Membranseite exprimiert. Diese Ergebnisse deuten klar darauf hin, dass die Sortierungssignale der Glykoproteine eine bedeutende Rolle für die basolaterale Virusfreisetzung auf polarisierten Endothelzellen spielen.

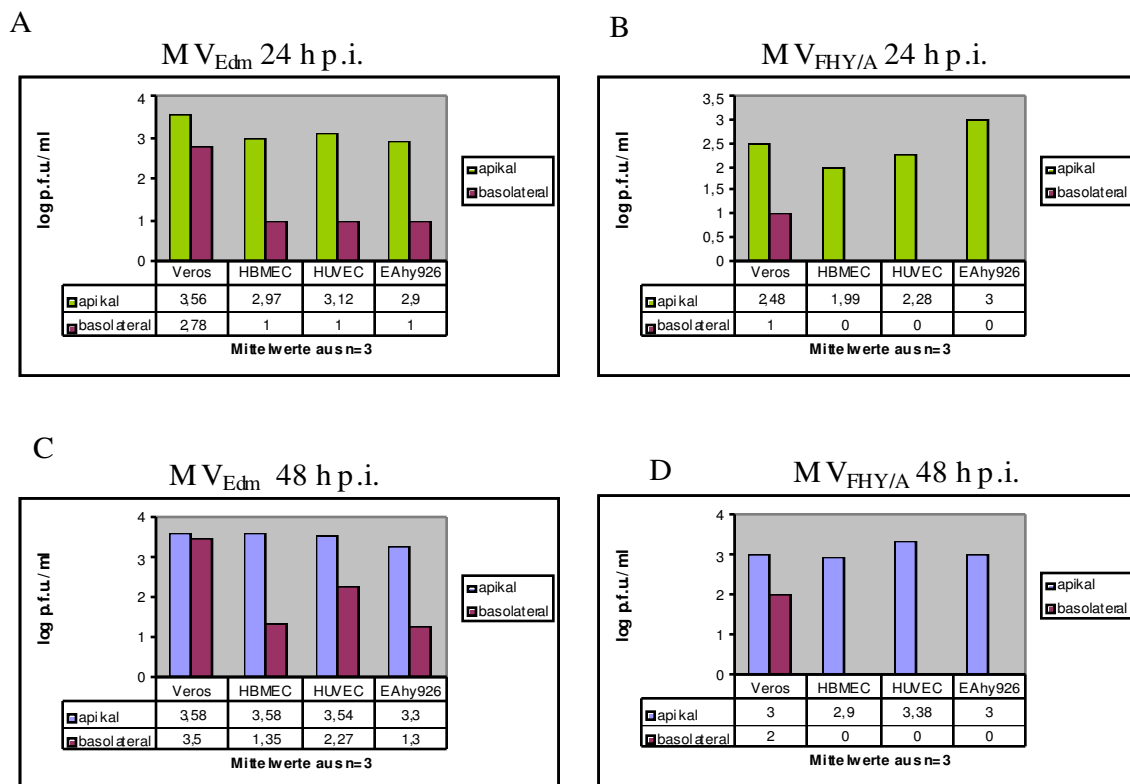
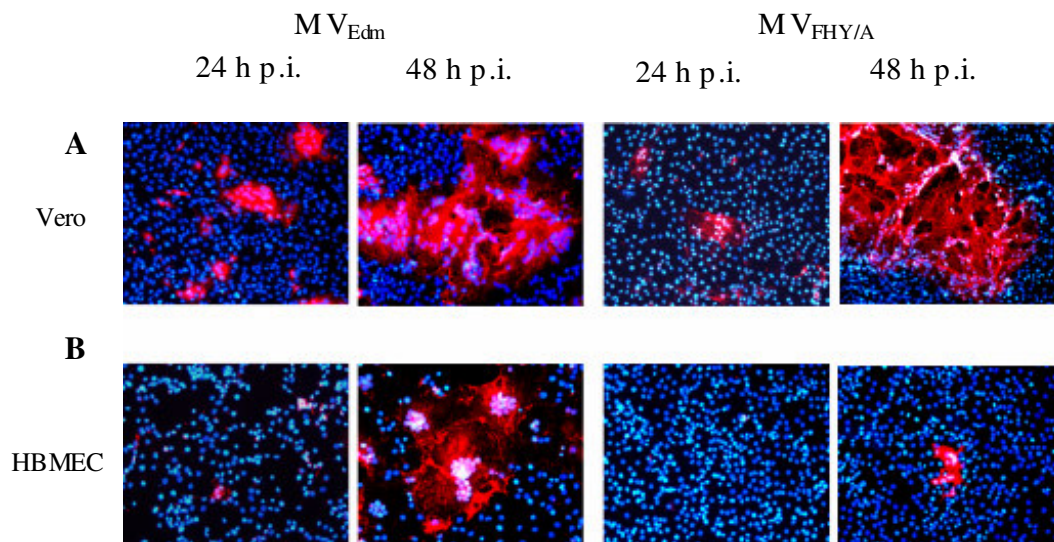


Abbildung 4.47: Graphische Darstellung der Virustiter in log p.f.u./ml von MV_{Edm} und $rMV_{FHY/A}$
 Nichtpolarisierte Verozellen und polarisierte Endothelzellen wurden auf Transwellfiltern (Porengröße $0,4\mu\text{m}$) für 3 Tage kultiviert und mit MV_{Edm} (A, C) und $rMV_{FHY/A}$ (B, D) $\text{MOI} = 0,1$ infiziert. Die Virusfreisetzung ins apikale und basolaterale Medium wurde mittels Plaque-Titration ermittelt. Die Mittelwerte ($n = 3$) der Virustiter des apikalen und basolateralen Mediums 24 und 48 h nach Infektion von den Vero, HBMEC, HUVEC und EAhy926 Zellen sind angegeben.

4.8.3 Virus-induzierte Zell-Zell-Fusion polarisierter Endothelzellen

In einem dritten Experiment wurde die Zell-Zell-Fusion und die Synzytiengröße von den mit MV_{Edm} bzw. $rMV_{FHY/A}$ infizierten unpolarisierten Vero- und polarisierten Endothelzellen mittels Immunfluoreszenz untersucht. In polarisierten Zellen hängt die Virusausbreitung von der Anwesenheit der viralen Glykoproteine und Rezeptoren auf der lateralen Kontaktseite ab, d. h. zwischen den Zellen, die zur basolateralen Seite gehört. 4×10^5 Zellen wurden pro Kammer eines Lab-Tek® II Chamber Slide mit 8 wells ausgesät und einen Tag später infiziert mit MV_{Edm} und $rMV_{FHY/A}$ mit einer MOI= 0,1. Zur Färbung des H-Proteins wurde der primäre Antikörper K4 in einer 1:100-Verdünnung verwendet und als sekundärer Antikörper Alexa-Fluor®594 (rot). Auf den Verozellen verbreiteten sich beide Viren effizient von Zelle zu Zelle und bildeten nach 48 h große Synzytien aus (siehe Abbildung 4.48, (A)). Im Gegensatz zu den unpolarisierten Verozellen wuchs das MV_{Edm} auf den polarisierten Endothelzellen schlechter (Abbildung 4.48, (B, C, D)), im Vergleich dazu war die Synzytiengröße von $rMV_{FHY/A}$ infizierten Endothelzellen jedoch noch kleiner.



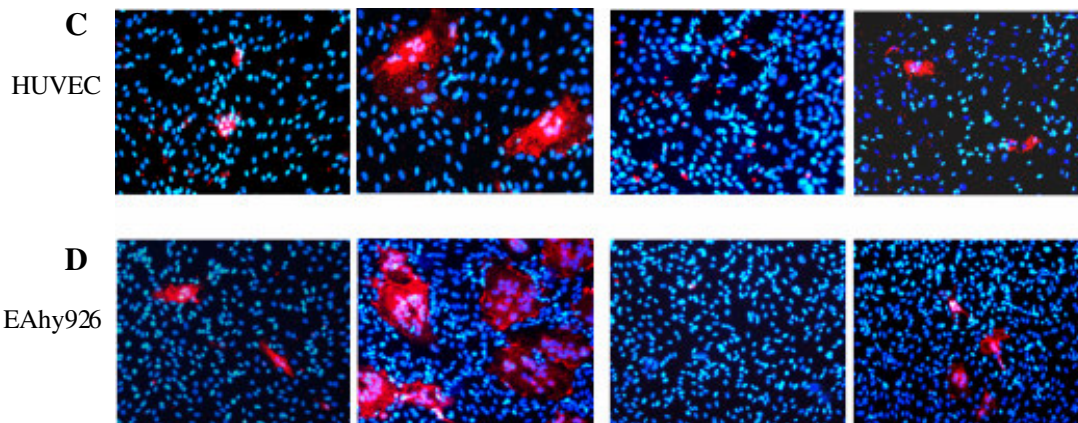


Abbildung 4.48: Immunfluoreszenz-mikroskopische Darstellung der Zell-Zell-Fusion von MV_{Edm} und rMV_{FHY/A} infizierten Vero- und polarisierten Endothelzellen.

Virusausbreitung von MV_{Edm} und rMV_{FHY/A} in konfluenten Vero und Endothelzellen. Vero (A), HBMEC (B), HUVEC (C) und EAhy926 (D) sind mit dem MV_{Edm} oder rMV_{FHY/A} mit einer MOI= 0,1 für 24 und 48 h infiziert worden. Die Zellen sind mit dem mAb K4 gegen das H-Protein und mit dem sekundären Alexa-Fluor®594 Antikörper (rot) gefärbt worden. Zellkerne zeigen eine blaue Färbung durch DAPI.

Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die auf Tyrosin basierenden Sortierungssignale im zytoplasmatischen Ende der MV-Glykoproteine für die Zell-Zell-Fusion und die basolaterale Virusfreisetzung benötigt werden.

5 Diskussion

5.1 Die Rolle von Gefäßendothelzellen bei der Pathogenese einer Masernvirusinfektion

Endothelzellen und Epithelzellen stellen bei der akuten Masernerkrankung wichtige Zielzellen dar. Es besteht aber immer noch die Frage, ob über infizierte Monozyten, B- oder T-Zellen Epithelzellen und Endothelzellen in den verschiedenen Organen wie Leber, Niere, Lunge, Gastrointestinaltrakt, Haut usw. infiziert werden (Griffin 2001).

Man vermutet, dass das charakteristische Masernexanthem durch die Infektion dermalen Kapillarendothelzellen erklärbar ist. Charakteristisch war der Nachweis von perivaskulären, leukozytären Infiltraten in der oberen Dermis (Kimura et al. 1975, Makino et al. 1994). Man konnte mittels Immunfluoreszenz virales Masernvirusantigen im Patientengewebe, das innerhalb von 4 Tagen nach Beginn des Exanthems entnommen wurde, nachweisen (Olding-Stenkvist et al. 1976). Es wurde in einzelnen Zellen in der Oberfläche des Epithel gefunden. Immunhistopathologische und elektronenmikroskopische Untersuchungen ergaben, dass das Masernvirus, Nachweise für deren Anwesenheit war das N-Protein, sich in der Epidermis, Schweißdrüsen und Haarfollikeln befand (Yanagihara et al. 1998). Außerdem konnte man Masernvirusantigene in kapillaren Endothelzellen von Lymphknoten und Thymus bei der akuten fatalen Masernviruserkrankung nachweisen (Moench et al. 1988). Endo- und Epithelzellen stellen bei der hämatogenen systemischen Ausbreitung der Viren eine Barriere zu Organen dar. Es gibt viele Studien und Theorien in der Literatur, die sich damit beschäftigen, wie Bakterien und auch Viren die Blut-Hirn-Schranke überwinden können.

Mit der vorliegenden Doktorarbeit möchte ich einen Beitrag zur Aufklärung des Zelltropismus von MV und möglicher Ausbreitungswege *in-vivo* leisten.

5.2 Auswahl des Zellkulturmodells

Zur Untersuchung der Wechselwirkung von infizierten Leukozyten mit vaskulären Endothelzellen *in-vitro* ist es wichtig, sich mit der Auswahl der Zellkulturmodelle der Situation *in-vivo* anzunähern. Für die Versuchsdurchführung wurden ausschließlich *human umbilical vein endothelial cells (HUVECs)* und *human brain microvascular endothelial cells (HBMECs)* verwendet.

HUVECs stellen in der Endothelzellsforschung ein etabliertes *in-vitro*-Modell für die zellbiologische Funktionalität vaskulärer Endothelzellen dar. Primäre Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene haben den Vorteil, noch nicht verändert worden zu sein z. B. durch eine Immortalisierung. Ein herausragender Vorteil ist ihr fetaler Ursprung. Ein Kontakt mit bakteriellen und/oder viralen Krankheitserregern hat wenig oder noch gar nicht stattgefunden. Desweiteren sind sie schnell und einfach zu isolieren (Jaffe et al. 1973, Marin et al. 2001).

HBMECs wurden aus Hirnbiopsien isoliert. Aufgrund der schwierigen Zellkultur, z. B. mögliche Kultur mit nicht-endothelen Zellen und die geringe Verfügbarkeit von humanen Patientenmaterial, wurden die humanen mikrovaskulären Hirnendothelzellen in frühen Passagen mit dem SV40-Large T-Antigen transfiziert und somit immortalisiert (Stins et al. 2000).

Die transfizierten HBMECs zeigen die typischen zerebrospezifischen Endothelzellmarker wie z. B. die Expression von γ -Glutamyltranspeptidase, Carboanhydrase IV und Ulex-europaeus-Agglutinin I. Das Expressionsniveau des von-Willebrand-Faktors nimmt jedoch mit zunehmender Passage ab (siehe Abbildung 4.2).

Mit diesen Eigenschaften qualifizieren sich die HBMECs als ein gutes *in-vitro*-Modell von Hirn-Endothelzellbarrieren.

5.3 MV-induzierte Blockierung der transendothelialen Migration von Leukozyten und Erhöhung der Integrinexpression

In Zellkultur-Experimenten konnte ich feststellen, dass die mit dem rMV_{IC323eGFP} infizierten primären T-Zellen stark in ihrer Fähigkeit, durch Endothelzellbarrieren zu wandern, eingeschränkt sind. Die MV-Infektion der PBMCs hat die Adhäsion auf Endothelzellen verstärkt. Der enge Zellkontakt führte zu einer Infektion der Endothelzellen mit einem Wildtypvirus, das den Rezeptor CD150 benutzt.

Die Adhäsion leitet die ersten Schritte der transendothelialen Migration ein (Engelhardt et al. 2004). Dazu gehört auch die Bildung von einer docking-Struktur, der Interaktion von Leukozyten mit Endothelzelle (Barreiro et al. 2002 und 2005, Carman et al. 2004, van Buul et al. 2007). Interessanterweise wurde die Migration der mit UV-inaktiviertem Virus behandelten T-Zellen nicht gehemmt. Dies deutet darauf hin, dass der Einfluss auf z. B. die Zytoskelett-Umformung, Aktinpolarisierung und CD3-Aggregation auf T-Zellen, die in einem Zeitraum von 2 h nach Virus-Zell-Kontakt beschrieben wurden, zeitlich begrenzt ist (Müller et al. 2006). Wie ich zeigen konnte, hat die MV-Infektion keinen großen Einfluss auf die Diapedese im allgemeinen genommen. Jedoch wurde die Fähigkeit der Leukozyten durch Endothelzellbarrieren zu wandern sehr wohl beeinflusst. Die Adhäsionsmoleküle VLA-4 und LFA-1 sind notwendig für die Transmigration, wobei VLA-4 als ein Rezeptor für das Rollen spielt und für die Aktivierung von LFA-1 beiträgt. Umgekehrt kann LFA-1 auch die Aktivierung von VLA-4 beeinflussen (Porter et al. 1997, Chan et al. 2000, Hogg et al. 2003). Die aktivierte Form von LFA-1 veranlaßt die T-Zelladhäsion und die lamellipodiale Bewegung, die durch die Myosin Light Chain Kinase am führenden Ende von der T-Zelle induziert wird. Die Ablösung des Leukozyten von der Endothelzelle wird durch RhoA und Rock am Uropod verursacht. In unserem Falle war die Expression und die Aktivierung von VLA-4 und LFA-1 erhöht worden in infizierten T-Zellen, das zu effizienter Adhäsion führte, aber auch zur Fehlregulation, weil sich die Zellen nicht wieder ablösen konnten und somit die Bewegung möglicherweise gehemmt war. Dies passt gut zu meinen Ergebnissen, dass die T-Zell Adhäsion und die

Ausbildung der docking-Struktur eintraten, jedoch aktiv wandernde infizierte T-Zellen nicht gefunden werden konnten.

Eine erhöhte LFA-1 Expression und Adhäsion auf Endothelzellen wurde schon vorher beobachtet und veröffentlicht (Attibele et al. 1992 und 1995, Nagendra et al. 1995, Soilu-Hänninen et al. 1996, Hummel et al. 1998). In allen vier Veröffentlichungen wurde die Monozytenzelllinie U937 mit nur CD46 benutzenden attenuierten Viren infiziert, da diese CD150 negativ sind (Erlenhoefler et al. 2001). Auch mit diesen Viren kam es zu einer erhöhten Expression von LFA-1. Desweiteren konnte in zwei von diesen Veröffentlichungen gezeigt werden, dass die Anwesenheit vom H-Protein für die verstärkte Adhäsion verantwortlich war. Der umgekehrt Fall, dass es durch eine Infektion der Endothelzellen zu einer verstärkten Adhäsion von Leukozyten kam, wurde schon veröffentlicht (MacGregor et al. 1980, Brankin et al. 1995). In dieser Arbeit haben wir demonstriert, dass der MV-Wildtyp stark die Expression und Aktivierung von LFA-1 und noch mehr von VLA-4 auf primären humanen T-Zellen stimuliert und somit eine MV-H-CD46-Interaktion für diese Vorgänge keine Rolle spielt.

Interessanterweise wurde bereits gezeigt, dass MV mit der Signaltransduktion von „lipid rafts“ interagiert (Avota et al. 2004). In diesen Cholesterol- und Spingolipidreichen Mikrodomänen, bekannt als „lipid rafts“, sind Integrine und andere Moleküle, die am Signalweg beteiligt sind, gefunden worden. Sie sind beteiligt an der Regulation der Aktivität von Integrinen (Leitinger et al. 2001). Diese Befunde können weitere Hinweise darauf sein, dass die Infektion einen Einfluss hat auf die Aktivierung der Integrine.

Eine Folge der Integrinaktivierung *in-vivo* könnte die durch die verstärkte Adhäsion der im peripheren Blut zirkulierenden Leukozyten an das Gefäßendothel verursachte Depletion sein, wie sie beobachtet worden ist, während einer MV-induzierten Leukopenie (Nanan et al. 1999).

Es ist vorstellbar, dass dieser Mechanismus auch zu der massiven MV-Infektion vom lymphatischen Gewebe beim Menschen beiträgt. Im Tiermodell konnte dies schon eindrucksvoll am Frettchenmodell nach einer Infektion mit CDV (Canine distemper

Virus) (von Messling et al. 2004) und beim Affen mit rMV_{IC323eGFP} (De Swart et al. 2007) gezeigt werden. In beiden Fällen fand man massiv infizierte T-, B-Zellen und Lymphgewebe wie z. B. Milz und Lymphknoten.

Eine weitere Folge der Integrinaktivierung *in-vivo* könnte die Infektion von Endothelzellen sein und damit die Virusfreisetzung auf der abluminalen Seite des Endothels. Es ist immer noch nicht bekannt, wie das Virus über die Blut-Hirn-Schranke ins Gehirn oder zu anderen Organen transportiert wird. Die Infektion der Endothelzellen könnte dabei eine wichtige Rolle spielen, da man während des Auftretens des MV-Exanthems infizierte Kapillarendothelzellen der Dermis, des Lymphknotens und des Thymus gefunden hat mittels Nachweis des Nukleokapsids (Kimura et al. 1975a/b, Moench et al. 1988). In den unterliegenden Epithelzellschichten breitet sich das Virus aus und führt zu lokalen entzündlichen Einwanderung von Zellinfiltraten (Kimura et al. 1975 a, Makino et al. 1994, Griffin 1996). Infizierte Endothelzellen sind auch in Geweben von Patienten mit der akuten Masernenzephalitis und in Gehirnen von SSPE Patienten gefunden worden (Kirk et al. 1991, McQuaid et al. 1993, Cosby et al. 1995, Esolen et al. 1995, Isaacson et al. 1996).

Eine Infektion der Leukozyten mit rMV_{IC323eGFP} führte zu einer erhöhten Expression der Chemokinrezeptoren CCR1, CCR2 und CCR5 auf den T-Zellen. Die erhöhte Expression der Chemokinrezeptoren konnte sich jedoch nicht positiv auf die Transmigration auswirken, dadurch, dass die Infektion der Integrine eine verstärkte Adhäsion der PBMCs zur Folge hatte. Aus der Literatur ist bekannt, dass die Infektion von Leukozyten mit HIV einen Anstieg der Expression des Chemokinrezeptors CCR2 bewirkte und damit eine gesteigerte Transmigration der Leukozyten durch die Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke verursachte (Eugenin et al. 2006).

Ich konnte anhand der Permeabilitätsuntersuchungen und des Nachweises des ZO-1 Proteins in den „tight junctions“ von infizierten Endothelzellen in unseren Experimenten zeigen, dass der konfluente Endothelzellmonolayer durch die Infektion nicht beeinträchtigt wird. Desweiteren ist aus der Literatur bekannt, dass HBMECs eine erniedrigte Permeabilität und eine erhöhte ZO-1 Expression zeigen unter Einfluss von Scherkräften bei Kokultivierung von Astrozyten (Siddarthan et al. 2007). Trotzdem

kann nicht ausgeschlossen werden, da noch ein kleiner Prozentsatz an infizierten Zellen migrieren kann, dass das Virus *in-vivo* über die Blut-Hirn-Schranke transportiert wird mittels infizierter Leukozyten als „Trojanisches Pferd“. Im Falle der HIV assoziierten Demenz oder Enzephalitits sind Berichte bekannt, bei denen das Virus über infizierte Leukozyten ins Gehirn gelang aufgrund einer Dysregulation der Blut-Hirn-Schranke (Toborek et al. 2003, Afonso et al. 2007). Dies wurde z. B. durch eine Degradation der „tight junctions“ Proteine durch Proteasome induziert von gp120 oder Apoptose der infizierten Endothelzellen verursacht (Toborek et al. 2003, Nakamuta et al. 2008). Im Falle des West-Nile-Virus konnte der Zusammenbruch der Blut-Hirn-Schranke nach einer Infektion nachgewiesen werden, aber nicht in Abwesenheit des „Toll-like“ Rezeptors, der durch den Tumor-Nekrose-Faktor α stimuliert wird (Wang et al. 2004). Ein Effekt von TNF- α auf die Funktion als Barriere der Blut-Hirn-Schranke konnte auch bei Infektion mit dem Ebola-Virus bestätigt werden (Wahl-Jensen et al. 2005).

In dieser Arbeit wurden die HBMECs als einfaches Hirn-Endothelzellbarrieremodell verwendet ohne Kokultivierung mit Astrozyten und/oder Mikrogliazellen. Trotzdem sollte der Einfluss, den Astrozyten auf das Transmigrationsverhalten haben könnten, nicht vernachlässigt werden. Zuvor wurde veröffentlicht, dass in Anwesenheit von mit dem Feline-Immunodeficiency-Virus (FIV) infizierten Astrozyten die Transmigration der uninfizierten PBMCs erhöht war (Hudson et al. 2005). Erklärt wurde dies durch eine erhöhte Produktion von Zytokinen und β -Chemokinen, die von infizierten Astrozyten als Immunantwort produziert wurden (Persidsky et al. 1999 a/b). Bei einer Kokultivierung mit uninfizierten Astrozyten trat ebenso eine Erhöhung der Transmigrationsrate von mit FIV infizierten PBMCs auf (Hudson et al. 2008).

Alternativ zur Überwindung der Blut-Hirn-Schranke könnte das Virus aber auch über den Riechnerv ins Gehirn übertragen werden mit anschließender Ausbreitung im Choroid Plexus und den zerebralen Blutgefäßen (Rudd et al. 2006).

5.4 Basolaterale Virusfreisetzung benötigt zytoplasmatische Transportsignale der MV-H- und F-Proteine

Ein bisheriges Modell der Masernviruspathogenese implizierte, dass nach einer Infektion des oberen Respirationstrakts das MV zu den lokalen Lymphknoten transportiert wird, wo es eine systemische Infektion etabliert. Makrophagen, Dendritische Zellen und Lymphozyten sind frühe Zielzellen, die das Virus über den Blutstrom zu den verschiedenen Organen transportiert (Griffin 2001). Kürzlich wurde veröffentlicht, dass Rhesus Affen erfolgreich infiziert werden konnten mit einem Masernvirus, das nicht den unbekanntem Epithelzellrezeptor sondern nur den SLAM-abhängigen Eintrittsweg benutzen kann. Diese Infektion verursachte die gewöhnlichen Reaktionen wie Exanthem und Virämie (Leonard et al. 2008, Takeda et al. 2008). Diese Ergebnisse unterstützen die Ansicht, dass CD150 der funktionale Rezeptor ist, der benötigt wird für den Beginn einer Infektion. Dieses Virus wurde allerdings nicht vom Respiratorischen Epithel des infizierten Wirtes freigesetzt, weil die Epithel-Zell-Rezeptor Interaktion benötigt wird für die basolaterale Infektion der Epithelzellen vom Respirationstrakt.

Die direkte Virusfreisetzung in bronchialen Epithel zur apikalen und basolateralen Seite kann bestimmen, ob eine virale Infektion begrenzt ist auf die Lungen oder sich verbreitet im restlichen Körper. Bei dem Sendai-Virus konnte bereits gezeigt werden, dass der Transport von Proteinen pathologisch sehr wichtige Konsequenzen hat (Tashiro et al. 1991). Wohingegen das „Budding“ von dem Sendai-Virus begrenzt ist auf die apikale Seite der polarisierten Zellen, konnte die systemische Freisetzung von der Mutanten F1-R beschrieben werden als bidirektionale Glykoprotein Expression und apikale und basolaterale Virusfreisetzung vom Bronchienepithel. Basierend hauptsächlich auf frühere Studien mit Vesikular-Stomatitis-Virus und Influenza-Virus, schlug dieses Modell vor, dass die Buddingspolarität ein Ergebnis ist der polarisierten und nicht-polarisierten Expression der viralen Glykoproteine (Fuller et al. 1984). Desweiteren ist bekannt, dass die polarisierte Expression vom viralen Matrixprotein eine wichtige Rolle spielt für die direkte Freisetzung der Hüllproteine von polarisierten

Zellen (Mebatsion et al. 1999, Naim et al. 2000, Sänger et al. 2001, Riedl et al. 2002, Mora et al. 2002).

Es wurde für Epithelzellen beschrieben, dass das MV hauptsächlich von der apikalen Seite von diesen polarisierten Zellen abgegeben wird (Blau & Compans et al. 1995). Ein Grund für das dominierende Budding von MV auf der apikalen Seite ist die exclusive apikale Expression des viralen Matrixproteins (M), das die Hüllproteine F und H dirigiert zu dieser Seite (Naim et al. 2000).

Im Gegensatz zum M-Protein enthalten die viralen Glykoproteine Signale, die den Transport zur basolateralen Seite unterstützen (Maisner et al. 1998). Diese auf Tyrosin basierenden Signale sitzen in den zytoplasmatischen Enden der F- und H-Proteine an der AS Position 549 und 12. Ein AS-Austausch an dieser Stelle hatte einen basolateralen Transport zur Folge (Moll et al. 2001). Die Wichtigkeit dieser Transportsignale für die basolaterale Zielbestimmung und für die Fusion von polarisierten Epithelzellen, wurde bereits in der Zellkultur bewiesen anhand von der Expression von Glykoproteinen mittels Plasmiden.

Die basolaterale Zell-Zell-Fusion von MV und die Virusausbreitung *in-vivo* im Respiratorischen Epithel von sind abhängig von diesen Transportsignalen (Moll et al. 2004). Uns stellte sich die Frage, ob diese Transportsignale auch bei Endothelzellen eine wichtige Rolle spielen. Aus diesem Grund haben wir den Transport der viralen Glykoproteine in drei Arten von Endothelzellen untersucht. Als Kontrolle für nicht-polarisierte Zellen wurden die Verozellen verwendet (Afrikanische Meerkatze).

Durch die Infektion von polarisierten Endothelzellen mit dem rMV_{FHY/A}, bei dem das basolaterale Transportsignal ausgeschaltet ist, bekamen wir Ergebnisse, die darauf hinwiesen, dass die auf Tyrosin basierenden Transportsignale notwendig sind für die basolaterale Feisetzung und die Zell-Zell-Fusion in polarisierenden Endothelzellen.

Die Aminosäuresequenzen, die verantwortlich sind für die Internalisation und Zielbestimmung der Transmembranproteinen in polarisierten Epithelzellen, scheinen allgemeingültige Strukturen mit der Sequenz YXXΦ (wobei Y Tyrosin ist, X jede beliebige AS und Φ eine AS mit einer hydrophoben Seitenkette) oder NPXY (wobei N

Asparagin und P Prolin ist) zu haben (Bonifacino et al. 1999). Die auf Tyrosin basierenden Transportsignale, die sich im zytoplasmatischen Teil der MV-Glykoproteine (⁵⁴⁹YVRSLS⁵⁵³ und ⁸INAFY¹² für F und H) passen nicht hundertprozentig zu den Standardmotiven YXXF und NPXY (Moll et al. 2001). Trotzdem konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass die Transportsignale in den MV-Glykoproteinen benötigt werden für die Zielortbestimmung der Proteine. Wie in Epithelzellen resultierte die Mutation des betreffenden Tyrosins in einer exklusiven apikalen Expression der H- und F-Proteine in polarisierten Endothelzellen. Die Abwesenheit der Oberflächenproteine auf der basolateralen Seite verhinderte eine Virusausbreitung von Zelle zu Zelle und basolaterale Virusfreisetzung. Dies deutet darauf hin, dass diese Transportsignale in den Glykoproteinen nicht nur eine wichtige Rolle in polarisierten Epithelzellen sondern auch bei der MV Ausbreitung in infizierten Endothelzellen und somit beim Überwinden von Endothelzellbarrieren spielen.

Zusammenfassung

Neben dem bekannten Tropismus des Masernvirus für CD150-positive aktivierte Zellen des Immunsystems, spielt der Endothelzelltropismus für die akute Masernviruserkrankung einschließlich ihren nachfolgenden Komplikationen eine wichtige pathogene Rolle. Die Infektion der Endothelzellen steht in Zusammenhang mit dem Auftreten des MV-Exanthems. Es ist auch möglich, dass die „Akute Enzephalitis“ und der Viruseintritt ins zentrale Nervensystem wie im Falle der subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE) durch Endothelzellinfektion vermittelt wird.

Ziel der Arbeit war herauszufinden, wie und ob das MV Endothelzellbarrieren überwinden kann mittels Transport infizierter Leukozyten oder durch Infektion von EZs mit basolateraler Virusfreisetzung. Es wurde untersucht, ob die Fähigkeit von primären humanen T- Zellen durch polarisierte Zellschichten von „*human brain microvascular endothelial cells*“ (HBMECs) zu wandern durch die Infektion beeinflusst wird.

Die Fähigkeit von infizierten Lymphozyten durch die Poren der Filter zu wandern war teilweise beeinträchtigt, jedoch war das Ergebnis statistisch nicht signifikant. Im Gegensatz dazu war die Fähigkeit der Zellen durch Endothelzellbarrieren zu wandern drastisch reduziert. Nach Infektion adhärten die Leukozyten stärker auf den Endothelzellen. Bei dieser Adhäsion von PBMCs an Endothelzellen kam es trotz Infektion zur Ausbildung von sogenannten „transmigratory cups“ oder docking-Strukturen. Dieser enge Zell-Zell-Kontakt hatte zur Folge, dass die MV-Infektion vom Lymphozyten auf die Endothelzelle übertragen wurde. Die MV-Hüllproteine wurden auf der apikalen und basolateralen Seite infizierter Endothelzellen exprimiert wie anhand von Aufnahmen mit dem konfokalen Mikroskop am Beispiel des H-Proteins gezeigt werden konnte. Titrations ergaben, dass das Virus auf beiden Seiten der Zellen freigesetzt wurde. Desweiteren wurde bestätigt, dass auch für polarisierte Endothelzellen die auf Tyrosin basierenden Transportsignale verantwortlich sind für die basolaterale Virusfreisetzung.

Die Daten unterstützen die Hypothese, dass das Virus mit Hilfe der Infektion und der bipolaren Virusfreisetzung über Endothelzellbarrieren gelangen kann.

Summary

In addition to the known tropism of measles virus (MV) for CD150-positive activated cells of the immune system, its endothelial cell tropism plays an important pathogenic role during acute measles and the following complications. The infection of endothelial cells is associated with the rash. It is also possible that endothelial infection mediates the acute encephalitis and viral entry in the central nervous system in cases of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE).

The aim of this investigation was to find out, how and if at all MV is able to overcome endothelial barriers via transport of infected leukocytes or infection of endothelial cells with basolateral virus release. We analysed if the capacity of primary human T cells to transmigrate through “*human brain microvascular endothelial cells*” (HBMECs) is influenced by the infection. The capacity of infected lymphocytes to migrate through filter pores was partially reduced but the results were statistically not significant. In contrast the capacity to migrate through endothelial barriers was drastically reduced. The attachment of PBMCs to the endothelial monolayer was increased once the cells were infected. During this attachment normal so called “transmigratory cups” or docking-structures were formed, although the leukocytes were infected. As a consequence of this close cell-cell-contact the MV-infection was transferred to the endothelial cells. The MV envelope proteins were expressed on the apical and basolateral side as could be shown on pictures taken with the confocal microscope. Titrations showed that the virus was released on both sides of the cells. Moreover it could be demonstrated, that tyrosine-based sorting signals were responsible for basolateral virus release from polarized endothelial cells.

These data support the hypothesis, that the virus can cross endothelial barriers by infection of the endothelium and by bipolar virus release.

Abkürzungen

Firmennamen sowie Artikelnummern der verwendeten Materialien sind meist ständigen Änderungen unterworfen und erheben daher keinen Anspruch auf aktuelle Gültigkeit.

Abkürzungen

Abb	Abbildung
APC	Alophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
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
ca.	circa
CCP	<i>(CD46) (engl.)</i> complement control protein
CCR	Chemokinrezeptor
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 <i>(dt.)</i> Hundestaupervirus
cm	Zentimeter
cm ²	Quadratmeter
d	<i>(lat.)</i> dies <i>(dt.)</i> Tag(e)

DABCO	1,4-Diazabicyclo[2.2.2]oktan
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol
DEPC	Diethylpyrrolidiniumcarbonat
DFG	Deutsche Forschungsgemeinschaft
DM SO	Dimethylsulfoxid
DM V	(<i>engl.</i>) dolphin morbillivirus
DNA	(<i>engl.</i>) desoxy-ribonucleic-acid (<i>dt.</i>) Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
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 (<i>dt.</i>) Endothelzellwachstumszusatz
ECL	(<i>engl.</i>) enhanced chemoluminescence
Edm	(<i>Bezeichnung eines Virusisolats</i>) (<i>engl.</i>) Edmonston
EDTA	(<i>engl.</i>) ethylenediaminetetraacetic acid (<i>dt.</i>) Ethylenediamintetraessigsäure
engl.	englisch
et al.	(<i>lat.</i>) et alii (<i>oder</i>) et aliae (<i>dt.</i>) und andere (<i>oder</i>) und weitere
F _x	Fusionsprotein (<i>eventuell 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	Fluoresceinisothiocyanat
fw	(<i>engl.</i>) forward
G	Gauge
g	(<i>bei Zentrifugationsschritten</i>) Gravitation
g	(<i>bei Mengenangaben</i>) Gramm

ggf.	gegebenenfalls
h	(<i>lat.</i>) hora(-ae) (<i>dt.</i>) Stunde(n)
H	Hämagglutinin
HBMEC	(<i>engl.</i>) human brain microvascular endothelial cells (<i>dt.</i>) humane mikrovaskuläre Hirnendothelzellen
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-2-ethansulfonsäure
Hg.	Herausgeber
HLA	(<i>engl.</i>) human leukocyte antigen (<i>dt.</i>) Humanes Leukozytenantigen
HLA <i>x</i>	HLA-Klasse- <i>x</i>
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
IFN- α	Interferon- α
IFN- γ	Interferon- γ
Ig	Immunglobulin(e)
IgG x	Immunglobulin G (<i>eventuell unter Angabe der Subklasse x</i>)
IL-1 β	Interleukin-1 β
ITSM(<i>SLAM</i>)	(<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
lat.	lateinisch
LPS	Lipopolysaccharid
M	Molar
mAb	(<i>engl.</i>) monoclonal antibody (<i>dt.</i>) monoklonale(-r/-n) Antikörper(s)

MCP	<i>(engl.)</i> membrane cofactor protein <i>(dt.)</i> Membran-Cofaktor-Protein
MEM	<i>(engl.)</i> minimum essential medium
µg	Mikrogramm
min	Minute(n)
ml	Milliliter
µl	Mikroliter
µm	Mikrometer
mM	Millimolar
mock	<i>(Scheinviruspräparation ohne Virus)</i>
mock v	<i>(Scheinviruspräparation ohne Virus mit Vero-Zellen)</i>
MOI	<i>(engl.)</i> multiplicity of infection
MV	Masemvirus
N	Nukleokapsid
n. b.	nicht bekannt
n. Chr.	nach Christus
nm	Nanometer
NP-40	<i>(Bezeichnung eines Detergens)</i>
Nr.	Nummer
PBMC	<i>(engl.)</i> peripheral blood mononuclear cells
PBS	<i>(engl.)</i> phosphate-buffered saline <i>(dt.)</i> Phosphat-gepufferte Salzlösung
PBS ⁽⁻⁾	PBS ohne Calcium- und Magnesiumionen
PE	Phycerythrin
pfu	<i>(engl.)</i> plaque forming unit <i>(dt.)</i> plaque-bildende Einheit
pH	<i>(lat.-griech.)</i> pondus Hydrogenii
PHA	Phytohämagglutinin
Prof.	Professor
%	Prozent
rev	<i>(engl.)</i> reverse
RIPA-Buffer	<i>(engl.)</i> radio immunoprecipitation assay buffer

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
s	Sekunde(n)
s.	siehe
S	Sedimentationskoeffizient nach Svedberg
SCR	(<i>CD46</i>) (<i>engl.</i>) short consensus repeat
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>CD46</i>) (<i>engl.</i>) serin-threonin-prolin-reich domain
SV40	(<i>engl.</i>) Simian (vacuolating) virus 40
TAE	(<i>engl.</i>) Tris-Acetate-EDTA
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylenediamin
TLR2	(<i>engl.</i>) toll-like receptor 2 (<i>dt.</i>) Toll-ähnlicher Rezeptor 2
TM	(<i>engl.</i>) trade mark
TNF- α	Tumor-Nekrose-Faktor- α
U	(<i>engl.</i>) unit(s) (<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	Ultravioletlicht
V	(<i>als Einheit einer Zahl</i>) Volt
V	(<i>Bezeichnung eines Masernvirusproteins</i>)
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
(w/v)	(<i>engl.</i>) weight per volume (<i>dt.</i>) Gewicht pro Volumen
x	(in Verbindung mit einer Zahl) –fach

Die Bezeichnungen von Zelllinien, Virusisolaten oder Antikörperklonen sind in den Kapiteln 2.1, 2.2 und 2.3 detailliert aufgeführt. Sowohl die Schreibweise und Bedeutung der chemischen Summenformeln nach Hill als auch Abkürzungen bei Literaturangaben im Standard der Medline dürfen vorausgesetzt werden.

Abbildungen und Tabellen

Abbildungen

	Seite
1.1. Schematische Abbildung eines Masernvirus mit gesondeter Auflistung der Hüllproteine	15
1.2. Schematische Darstellung des MV-Genoms mit Transkriptionsgradient	18
1.3. Die zellulären Rezeptoren CD46 und CD150 des Masernvirus	19
1.4. Die einzelnen Schritte der Leukozytenmigration	22
3.1 Schematische Darstellung der Isolierung von Endothelzellen aus einer Nabelschnurvene	48
3.2 Transwellfiltersystem	49
3.2 Durchflusszytometrische Charakterisierung der PBMC Population	51
4.1 Fluoreszenzmikroskopische Darstellung von UEA bei HUVECs und HBMECs	63
4.2 Fluoreszenzmikroskopischer Nachweis von vWF bei HUVECs und HBMECs	64
4.3 Darstellung der biotinylierten Oberflächenproteine von polarisierten Endothelzellen	65
4.4 Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung des ZO-1 Proteins	66
4.5 Graphische Darstellung der Permeabilität von einem uninfizierten EZ-Monolayer	67
4.6 Graphische Darstellung der Permeabilität eines infizierten EZ-Monolayers	68
4.7 Zytometrische Darstellung von CD62, CD106 und CD54	69
4.8 Zytometrische Darstellung der CD69 Expression von PBMCs	70
4.9 Zytometrische Darstellung der CD150 Expression von PBMCs	71
4.10 Schematische Darstellung des zeitlichen Ablaufs der Transmigration	72

4.11	Durchflusszytometrische Bestimmung des prozentualen Anteils an infizierten T-Zellen von der Gesamtkultur	72
4.12	Zytometrische Darstellung des Transmigrationsversuchs	73
4.13	Zytometrische Darstellung von 7AAD markierten T-Zellen	75
4.14	Graphische Darstellung der prozentualen Zusammensetzung von infizierten toten und lebenden T-Zellen aus der basolateralen Filterkammer	76
4.15	Graphische Darstellung der transmigrierten infizierten T-Zellen in % zum Zeitpunkt "früh" ohne Endothelzellmonolayer	77
4.16	Graphische Darstellung der transmigrierten infizierten T-Zellen in % zum Zeitpunkt "spät" ohne Endothelzellmonolayer	77
4.17	Graphische prozentuale Darstellung der infizierten T-Zellen von der Gesamtkultur ohne Endothelzellmonolayer	78
4.18	Graphische Darstellung der transmigrierten infizierten T-Zellen in % zum Zeitpunkt "früh" mit Endothelzellmonolayer	79
4.19	Graphische prozentuale Darstellung der transmigrierten T-Zellen in % zum Zeitpunkt "spät" mit Endothelzellmonolayer	79
4.20	Graphische prozentuale Darstellung der infizierten T-Zellen von der Gesamtkultur und transmigrierter infizierter T-Zellen mit Endothelzellmonolayer	80
4.21	Graphische prozentuale Darstellung der adhärennten uninfizierten und infizierten T-Zellen berechnet aus den Transmigrationsdaten	81
4.22	Graphische Darstellung der Adhäsion und Adhäsionshemmung der PBMCs	83
4.23	Durchflusszytometrische Darstellung von infizierten bzw. uninfizierten und HUTS-4 positiven T-Zellen	84
4.24	Zytometrische Darstellung der NKI-L16 und HUTS-4 positiven T-Zellen	85
4.25	Graphische Darstellung der LFA-1 (CD18) Expression von T-Zellen	86
4.26	Graphische Darstellung der LFA-1 (CD11a) Expression von T-Zellen	86
4.27	Graphische Darstellung der LFA-1 (NKI-L16) Expression von T-Zellen	87
4.28	Graphische Darstellung der VLA-4 (CD29) Expression von T-Zellen	87
4.29	Graphische Darstellung der VLA-4 (HUTS-4) Expression von T-Zellen	88
4.30	Graphische Darstellung der CCR1 Expression auf T-Zellen	89
4.31	Graphische Darstellung der CCR2 Expression auf T-Zellen	89

4.32	Graphische Darstellung der CCR5 Expression auf T-Zellen	90
4.33	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einer docking-Struktur	91
4.34	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einer docking-Struktur mit einer infizierten T-Zellen	92
4.35	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einer "Doppel-docking-Struktur"	93
4.36	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einer docking-Struktur mit einer infizierten T-Zelle	93
4.37	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von einer HUVEC-Zelle mit docking-Struktur	94
4.38	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von VCAM (rot) und CD29 (gelb)	95
4.39	Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von ICAM (rot) und CD18 (blau)	95
4.40	Phasenkontrastaufnahme von einem Endothelzellmonolayer mit Überlagerung der grünen Fluoreszenz der infizierten Lymphozyten	96
4.41	Phasenkontrast- und Fluoreszenzaufnahme von infizierten Endothelzellen	97
4.42	ZO-1 Färbung von infizierten HUVECs	98
4.43	Apikale und basolaterale Verteilung vom MVH-Glykoprotein	99
4.44	Graphische Darstellung der Virusfreisetzung von rMV _{IC323eGFP} infizierten HBMECs	100
4.45	Aminosäuresequenz der F- und H-Proteine des Masernvirus	101
4.46	Apikale und basolaterale Verteilung der MV F- und H-Glykoproteine	102
4.47	Graphische Darstellung der Virustiter in log p.f.u./ ml von MV _{Edm} und rMV _{FHY/A}	103
4.48	Immunfluoreszenzmikroskopische Darstellung der Zell-Zell-Fusion von MV _{Edm} und rMV _{FHY/A} infizierten Vero- und polarisierten Endothelzellen	105

Tabellen

2.1	Übersicht über die verwendeten Zellarten und deren Herkunftspezies	26
2.2	Übersicht über die verwendeten Masernvirusstämme	27
2.3	Übersicht über die verwendeten monoklonalen Primärantikörper	28
2.4	Übersicht über die verwendeten konjugierten, polyklonalen Sekundärantikörper	30
4.1	Messwerte der Fluoreszenzintensitäten von FITC-Dextran	67
4.2	Messwerte der Fluoreszenzintensitäten von FITC-Dextran	68
4.3	Messwerte der Fluoreszenzintensitäten der mit R18 gefärbten Leukozyten	82

Literatur

Alkhatib G, Richardson C, Shen SH. 1990

Intracellular processing, glycosylation, and cell-surface expression of the measles virus fusion protein (F) encoded by a recombinant adenovirus. *Viol.* 1990; 175: 262-270

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: 471-480

Afonso PV, Ozden S, Prevost MC, Schmitt C, Seilhean D, Weksler B, Couraud PO, Gessain A, Romero IA, Ceccaldi PE. 2007

Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *J. Immunol.* 2007; 179: 2576-83

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.

Andres O, Obojes K, Kim KS, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. 2003

CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J. Gen. Virol.* 2003; 83: 1189-1197

Attibele N, Wyde P, Trial J, Smole S, Smith C, Rossen R. 1993

Measles virus-induced changes in leukocyte function antigen 1 expression and leukocyte aggregation: possible role in measles virus pathogenesis. *J. of Virol.* 1993; 67: 1075-1079

Aversa G, Carballido J, Punnonen J, Chang CC, Hauser T, Cocks BG, De Vries. 1997

SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses. *Immunol. Cell Biol.* 1997; 75: 202-205.

Bankamp B, Horikami SM, Thompson PD, Huber M, Billeter M, Moyer SA. 1996

Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly. *Virology*. 1996; 216: 272-277

Barreiro O, Yanez-Mo M, Serrador JM, Montoya MC, Vicente-Manzanares, Tejedor R, Furthmayr H, Sanchez-Madrid F. 2002

Dynamic interaction of VCAM-1 and ICAM-1 with moesin and ezrin in a novel endothelial docking structure for adherent leukocytes. *J. Cell Biol.* 2002; 157: 1233-1245

Barreiro O, Yanez-Mo M, Sala-Valdes, Gutierrez-Lopez MD, Higginbottom A, Monk P, Cabanas C, Sanchez-Madrid F. 2005

Endothelial tetraspanin microdomains regulate leukocyte firm adhesion during extravasation. *Blood* 2005; 105: 2852- 2861

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: 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: 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: 1686-1693

Bonifacino JS, Esteban C. 1999

Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J. Cell Biol.* 1999; 145: 923-926

Boyle EC, Brown NF, Finlay BB. 2006

Salmonella enterica serovar Typhimurium effectors SopE, SopE2 and SipH disrupt tight junction structure and function. *Cell Micro.* 2006; 8: 1946-1957

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: 1-8

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 to its receptor CD46. *J. Biol. Chem.* 1997; 272: 22072-22079

Buul van J, Allingham M, Samson T, Meller J, Boulter E, Garcia-Mata R, Burridge K. 2007

RhoG regulates endothelial apical cup assembly downstream from ICAM-1 engagement and is involved in leukocyte trans-endothelial migration. *J. Cell Biol.* 2007; 178: 1279-1293

Carman, CV, Springer TA. 2004

A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J. Cell Biol.* 2004; 167: 377-388

Casasnovas JM, Larvie M, Stehle T. 1999

Crystal structure of two CD46 domains reveals an extend measles virus-binding surface. *EMBO J.* 1999; 18: 2911-2922

Cattaneo 1988

Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles virus in human brain infections. *Cell.* 1988; 55: 255-265

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: 260-263

Cole JI, 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: 859-863

Cosby SL, Brankin B. 1995

Measles virus infection of cerebral endothelial cells and effect on their adhesive properties. *Vet. Microbiol.* 1995; 44: 135-9

De Swart RL, Ludlow M, de Witte L, Yanagi Y, van Amerogen G, McQuaid S, Yuksel S, Geijtenbeek TB, Duprex WP, Osterhaus AD. 2007

Predominant infection of CD150(+) lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *Plos. Pathog.* 2007; 3: e178

Devaux P, Cattaneo R. 2004

Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. *Virology.* 2004; 78: 11632-11640

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

The human CD 46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.* 1993; 75: 295-305

Duprex P, Rima B. 2005

Molecular mechanism of measles virus persistence. *Virus Research* 2005; 111: 132-147

Edgell C J, Mc Donald C, Graham J. 1983

Permanent cell line expressing human factor VIII-related antigen established by hybridization. *Cell Biol.* 1983; 80: 3734-3737

Endres JF, Peebles TC. 1954

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

Engelhardt B, Wolburg H. 2004

Transendothelial migration of leukocytes: through the front door or around the side of the house. *Eur. J. Immunol.* 2004; 34: 2955-2963

Erlenhoef er C, Wurzer WJ, Loeffler 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. *Virology.* 2001; 75: 4499-4505

Erlenhoef er 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: 1431-1436

Escoffier C, Manie S, Vincent S, Muller CP, Billeter M, Gelier D. 1999

Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *Virology.* 1999; 73: 1695-1698

Esolen M, Takahashi K, Johnson R, Vaisberg A, Moench T. 1995

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

Eugenin E, Osiecki K, Lopez L, Goldstein H, Calderon T, Berman J. 2006

CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 mediates enhanced transmigration of human immunodeficiency virus (HIV)-infected leukocytes across the blood-brain-barrier: A potential mechanism of HIV-CNS invasion and neuroAIDS. *J. Neurosci.* 2006; 26: 1098-1106

Garg Rk 2002

Subacute sclerosing panencephalitis. *Postgrad. Med. J.* 2002; 78: 63-70

Gendelman HE., Boisset GF. 1984

Measles encephalomyelitis: lack of evidence of viral invasion of the central nervous system and quantitative study of the nature of demyelination. *Ann. Neurol.* 1984; 15: 353-60

Gerlier D, Loveland B, Varior- Krishnan G, Thorley B, McKenzie IF, Raboudin-Combe 1994

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

Griffin D. E. 2001

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

Goodship T.H, Liszewski MK, Kemp E.J., Richards A, Atkinson JP. 2004

Mutations of CD46, a complement regulatory protein, predispose to atypical HUS. *Trends Mol. Med.* 10: 226-231

Hamalainen H, Meissner S, Lahesmaa R. 2000

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

Hannah MJ, Williams R, Kaur J, Hewlett LJ, Cutler DF. 2002

Biogenesis of Weibel-Palade bodies. *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2002; 13: 313-324

Holthöfer H, Virtanen I, Kariniemi AL, Hormia M, Linder E, Miettinen A. 1982

Ulex euopaeus I lectin as a marker for vascular endothelium in human tissues. *Lab. Invest.* 1982; 47: 60-66

Horikami SM, Moyer SA. 1995

Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr. Top Microbiol. Immunol.* 1995; 191:35-50.

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. *Virology.* 1998; 72: 2905-2916

Hu A, Cathomen T, Cattaneo R, Norrby E. 1995 a

Influence of N-linked oligosaccharide chains on the processing, cell surface expression and function of the measles virus fusion protein. *J. Gen. Virol.* 1995; 76: 705-710

Hu A, Cattaneo R, Schwartz S, Norrby E. 1994 b

Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein. *J. Gen. Virol.* 1994; 75: 1043-1052

Hu A, Kovamees J, Norrby E. 1994

Intracellular processing and antigenic maturation of measles virus hemagglutinin protein. *Arch. Virol.* 1994; 136: 239-253

Hummel K, Bellini WJ, Offerman MK. 1998

Strain-specific differences in LFA-1 induction of measles virus-infected monocytes and adhesion and viral transmission to endothelial cells. *Virology.* 1998; 72: 8403-8407

Hudson LC, Bragg DC, Tompkins MB, Meeker RB. 2005

Astrocytes and microglia differentially regulate trafficking of lymphocyte subsets across brain endothelial cells. *Brain Research.* 2005; 1058: 148-160

Hudson LC, Tompkins MB, Meeker RB. 2008

Endothelial cell suppression of peripheral blood mononuclear cell trafficking in vitro during acute exposure to feline immunodeficiency virus. *Cell tissue Res.* 2008; 334: 55-65

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

Widespread, restricted low-level measles virus infection of brain in a case of subacute sclerosing panencephalitis. *Acta. Neuropathol.* 1996; 91: 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: 2745-2756.

Kerdiles Y. M. 2005

Immunosuppression caused by measles virus: role of viral proteins. *Med. Virol.* 2006; 16: 49-63

Kimura A, Tosaka K, Nakao T. 1975 a

An immunofluorescent and electron microscopic study of measles skin eruptions. *Tohoku J Exp. Med.* 1975; 117: 245-56

Kimura A, Tosaka K, Nakao T. 1975 b

Measles rash. I. Light and electron microscopic study of skin eruptions. *Arch. Virol.* 1975; 47: 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

Kwang Sik Kim. 2008

Mechanism of microbial traversal of the blood-brain-barrier. *Nature Microbiol.* 2008; 6: 625-634

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 CD 46 downregulation: phenotypic markers that differentiate vaccine and wild-type MV strains. *Virology.* 1996; 70: 4200-4204

Leitinger B, Hogg N. 2002

The involvement of lipid rafts in the regulation of integrin function. *J. Cell Sci.* 115: 963-972

Leonard V, Sinn P, Hodge G, Miest T, Devaux P, Oezguen N, Braun W, McCray P, McChesney M, Cattaneo R. 2008

Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 2448-2458

MacGregor RR, Friedman HM, Macarak EJ, Kefalides NA. 1980

Virus infection of endothelial cells increases granulocyte adherence. *J. Clin. Invest.* 1980; 65: 1469-77

Maisner A, Kenk HD, Herder G. 1998

Polarized budding of measles virus is not determined by viral glycoproteins. *Virology.* 1998; 72, 5276- 5278

Makino S, Yamaguchi F, Sata T, Urushibata O, Kurata T, Nishiwaki M. 1994

The rash of measles is caused by a viral infection in the cells of the skin: a case report. *J. Dermatol.* 1994; 21: 741-5

Malvoisin E, Wild TF. 1993

Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins. *J. Gen. Virol.* 1993; 74: 2365-2372

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

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

Manchester M, Valsamakis A, Kaufmann 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: 2303-2307

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

Clinical isolates of measles virus use CD46 as a cellular receptor. *Virology*. 2000; 74: 3967-3974

Manchester M, Nanche D, Stehle T 2000b

CD46 as a measles receptor: form follows function. *Virology*. 2000; 274: 5-10

Marin V, Kaplanski G, Gres s, Famrier C, Bongrand P. 2001

Endothelial cell culture: protocol to obtain and cultivate human umbilical endothelial cell. *J. Immunol. Methods*. 2001; 254: 183-190.

McQuaid S, Kirk J, Zhou AL, Allen IV. 1993

Measles virus infection of cells in perivascular infiltrates in the brain in subacute sclerosing panencephalitis: confirmation by non-radioactive in situ hybridization, immunocytochemistry and electron microscopy. *Acta. Neuropathol*. 1993; 85: 154-158

Mebatsion T, Weiland & Conzelmann KK. 1999

Matrix protein of rabies virus is responsible for the assembly and budding of the bullet-shaped particles and interacts with the transmembrane spike glycoprotein G. *Virology*. 1999; 73: 242-250

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

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

Modrow 2003

Das Masernvirus in: *Molekulare Virologie*. Spektrum Verlag. Aufl. 2003. 284-228

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: 433-42

Moll M, Klenk HD, Herrler G, Maisner A. 2001

A single amino acid change in the cytoplasmic domains of measles virus glycoproteins H and F alters targeting, endocytosis, and cell fusion in polarized Madin-Darby Kidney cells. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 17887-17894

Moll M, Pfeuffer J, Klenk HD, Niewiesk S, Maisner A 2004

Polarized glycoprotein targeting affects the spread of measles virus in vitro and in vivo. *J. Gen. Virol.* 2004; 85: 1019-1027

Mora R, Rodriguez-Boulan E, Palese P, & Garcia-Sastre A. 2002

Apical budding of a recombinant influenza A virus expressing a hemagglutinin protein with a basolateral localization signal. *Virology.* 2002; 76: 3544-3553

Mukaida N, Harada A, Matsushima K. 1998

Interleukin-8 (IL-8) and monocyte chemoattractant and activating factor (MCAF/MCP-1), chemokines essentially involved in inflammatory and immune reactions. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1998; 9: 9-23

Müller N, Avota E, Schneider-Schaulies J, Harms H, Krohne G, Schneider-Schaulies S. 2006

Measles virus contact with T cells impedes cytoskeletal remodelling associated with spreading, polarization, and CD3 clustering. *Traffic.* 2006; 7: 849-858.

Mumenthaler C, Schneider U, Buchholz C, Koller D, Braun W, Cattaneo R. 1997

A 3 D model for the measles virus receptor CD46 based on homology modeling, Monte Carlo simulations, and hemagglutinin binding studies. *Protein Sci.* 1997; 6: 588-597

Nagendra A, Smith W, Wyde P. 1995

Evidence that measles virus hemagglutinin initiates modulation of leukocyte function-associated antigen 1 expression. *J. Virol.* 1995; 69: 4357-4363

Naim H Y, Ehler E, Billeter MA. 2000

Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial . EMBO J. 2000; 19: 3576-3585.

Nakamuta S, Endo H, Higashi Y, Kousaka A, Yamada H, Yano M, Kido H. 2008

Human immunodeficiency virus type 1 gp120-mediated disruption of tight junction proteins by induction of proteasome-mediated degradation of zonula occludens-1 and -2 in human brain microvascular endothelial cells. J. Neurovirol. 2008; 14: 186-95

Nanan R, Chittka B, Hadam H, Kreth HW. 1999

Measles virus infection causes transient depletion of activated T cells from peripheral circulation. J. Clin. Virol. 1999; 12: 201-210

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. Virology. 1993; 67: 6025-6032

Nichols WC, Ginsburg D. 1997

Von Willebrand disease. Medicine (Balimore). 1997; 76: 1-20

Norrby E., Kristensson K. 1997

Measles virus in the brain. Brain Res. Bull. 1997; 3: 213-220

Norrby E., Oxman M. 1990

Measles Virus. in: Fields' Virology. Hg. Knipe DM. 2. Aufl. 1990; 1013-1038

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. 1997; 94: 444-449

Olding-Stenkvis E, Bjorvatn B. 1976

Rapid detection of measles virus in skin rashes by immunofluorescence. *J. Infect. Dis.* 1976; 134: 463-469

Palosaari H, Parisien J P, Rodriguez J, Ulane C, Horvath C. 2003

STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein. *Virology.* 2003; 77: 7635-7644

Paterson RG, Leser GP, Shaughnessy MA, Lamb RA. 1995

The paramyxovirus SV5 V protein binds two atoms of zinc and is a structural component of virions. *Virology.* 1995; 208: 121-131

Persidsky Y. 1999 a

Model system for studies of leukocyte migration across blood-brain barrier. *J. Neurovirol.* 1999; 5: 579-90

Persidsky Y, Ghorpade A, Rasmussen J, Limoges J, Liu XJ, Stins M, Fiala M, Way D, Kwang Sik Kim, Witte M, Weinand M, Carhart LR, Gendelman H. 1999 b

Microglia and astrocytes chemokines regulate monocyte migration through the blood-brain barrier in human immunodeficiency virus-1 encephalitis. *Am. J. Pathol.* 1999; 155: 1599-1611

Plembler RK, Hammond AL, Cattaneo R. 2001

Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum. *J. Biol. Chem.* 2001; 276: 44239-44246

Reuter T, Weissbrich B, Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J. 2006

RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *Virology.* 2006; 80: 5951-5957

Richardson C, Berkovich A, Rozenblatt S, Bellini W.J. 1985

Use of antibodies directed against synthetic peptides for identifying cDNA clones, establishing reading frames and deducing the gene order of measles virus. *Virology*. 1985; 54: 186-193

Richardson C, Hull D, Greer P, Hasel K, Berkovich A, Englund G, Bellini W, Rima B, Lazzarini R. 1986

The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses. *Virology*. 1986; 155: 508-523

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

CD46: expanding beyond complement regulation. *Trends Immunol*. 2004; 25: 496-503

Robert-Koch-Institut 2006 a

Masern-Eliminierung in Deutschland - weitere verstärkte Anstrengungen erforderlich. *Epidemiol. Bull.* 2006; 22: 170

Robert-Koch-Institut 2006 b

Zielgruppengerechte Umsetzung von Masern-Impfangeboten durch das Gesundheitsamt bei Kindern aus Migrantenpopulationen innerhalb und außerhalb sozialer Brennpunkte. *Epidemiol. Bull.* 2006; 22: 171

Rosen G. 1958

Trends in american public health, from the colonial period to the present. *Int. Rec. Med. Gen. Pract. Clin.* 1958; 171: 501-515

Rudd P, Cattaneo R, von Messling Veronika. 2006

Canine distemper virus uses both the anterograde and the hematogenous pathway for neuroinvasion. *Virology*. 2006; 80: 9361-9370

Sänger C, Mühlberger E, Ryabchikova E, Kolesnikova L, Klenk, HD & Becker S. 2001
Sorting of marburg virus surface protein and virus release take place at opposite surfaces of infected polarized epithelial cell. *Virology*. 2001; 75: 1274-1283

Sato TA, Kohama T, Sugiura A 1988

Intracellular processing of measles virus fusion protein. *Arch. Virol.* 1988; 98: 39-50

Schaffer J, Bellini W, Rota P. 2003

The C-protein of measles virus inhibits the type I interferon response. *Virology*. 2003; 315: 389-397

Schneider-Schaulies J, Schnorr JJ, Brinckmann U, Dunster LM, Baczko 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. *Virology*. 1995; 69: 7257-7259

Schneider-Schaulies J, Schneider-Schaulies S. 2008

Receptor interactions, tropism, and mechanisms involved in Morbillivirus-induced immunomodulation. *Adv. Virus Res.* 2008; 71: 173-205

Sidorenko SP, Clark EA. 2003

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

Siddharthan V, Kim Y, Liu S, Kim KS. 2007

Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Research* 2007; 1147: 39-50

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

Measles virus hemagglutinin mediates monocyte aggregation and increased adherence to measles-infected endothelial cell. *Med. Microbiol. Immunol.* 1996; 185: 73-80

Stem LB, Greenberg M, Gershoni JM, Rozenblatt S. 1995

The hemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *Virology.* 1995; 69: 1661-1668

Stins F, Gilles F, Kim KS. 1997

Selective expression of adhesion molecules on human brain microvascular endothelial cells. *J. Neuroimmunol.* 1997; 76: 81-90

Stins F, Badger J, Kim KS. 2000

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

Suryanarayana K, Bacsko K, ter Meulen V, Wagner R. 1993

Transcription inhibition on other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *Virology.* 1993; 68: 1532-1543

Swerlick RA, Lee, KH, Li LJ. 1992

Regulation of vascular cell adhesion molecule 1 on human dermal microvascular endothelial cells. *J. Immunol.* 1992; 149: 698-705

Takeda M. 2008

Measles virus breaks through epithelial cell barriers to achieve transmission. *J. Clin. Invest.* 2008; 118: 2386-2389

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

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

Tatsuo H, Ono N, Tanaka Km Yanagi Y. 2000

SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature*. 2000; 406: 893-7

Toborek M, Yong Woo Lee, Flora G, Hong Pu, Ibolya E. Andras, Wylegala E, Henning B, Nath A. 2005

Mechanisms of the blood-brain barrier disruption in HIV-1 infection. *Cell and Mol. Neurobiol.* 2003; 25: 181-199

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, 9: 4350-4354.

Von Messling V, Milosevic D, Cattaneo R. 2004

Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. *Proc Natl Acad. Sci. USA* 2004; 101: 14216-21

Wang T, Town T, Alexopoulos L, Anderson JF, Fikrig E, Flavell RA. 2004

Toll-like receptor 3 mediates West Nile virus entry into the brain causing lethal encephalitis. *Nat. Med.* 2004; 10: 1366-73

Weibel ER, Palade GE. 1964

New cytoplasmic components in arterial endothelial cells. *J. Cell Biol.* 1964; 23: 101-112

World Health Organization 2007

WHO receives cash boost in fight against measles. Manila: World Health Organisation, January 2007.

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

Measles virus was present in the inner cell of the acrosyringium in the skin rash. *Pediatr. Dermatol.* 1998; 15: 456-458

Yasumura Y, Kawakita Y. 1963

The research for the SV 40 by means of tissue culture technique. Nippon Rinsho. 1963; 21:
1201-1219

Danksagung

Der experimentelle Teil der vorliegenden Dissertation wurde in der Zeit von April 2005 bis Dezember 2008 am Lehrstuhl für Virologie des Instituts für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg angefertigt.

Meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. rer. nat. Jürgen Schneider-Schaulies danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für die sehr gute Betreuung der Doktorarbeit, die stete Diskussionsbereitschaft, das geschenkte Vertrauen in eine Pharmazeutin und für die schnelle Korrektur dieses Werkes.

Frau Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe möchte ich für die Übernahme des Zweit-Gutachtens seitens der pharmazeutischen Fakultät danken.

Auch der Deutschen Forschungsgesellschaft, die das Projekt seit Januar 2002 innerhalb des Schwerpunktprogramms 1130 „Infektionen des Endothels“ (DFG SCHN 320/9-1) unterstützt, gebührt mein Dank.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen Markus Fehrholz, Sabine Kendl, Dajana Reuter, Katrin Singethan und Michael Zinke für die hilfsbereite Einarbeitung und das freundliche Arbeitsklima bedanken. Der Arbeitsgruppe von Frau Prof. Dr. rer. nat. Sibylle Schneider-Schaulies bin ich für die konstruktive Zusammenarbeit sehr verbunden.

Gewidmet ist die Dissertation meiner Mutter, die mir das Pharmaziestudium und die experimentelle Forschungsarbeit zur Promotion ermöglicht hat, sowie meinem Ehemann Alexander, der drei Jahre lang von mir alleine gelassen worden ist und viel gemeinsame Zeit entbehren musste.

Bei Herrn Karl-Hermann Meiswinkel möchte ich mich bedanken für die hilfreiche Unterstützung in schweren familiären Lebensphasen.