

Untersuchung der Masernvirus- induzierten Immunsuppression im Baumwollrattenmodell

The seal of the University of Würzburg is a large, circular emblem in the background. It features a central figure, likely a saint or historical figure, surrounded by intricate patterns and text. The outer ring of the seal contains the Latin text 'SIGILLUM UNIVERSITATIS HEILBRUNNENSIS' at the top and 'SIGILLUM UNIVERSITATIS WÜRZBURGENSIS' at the bottom. The year '1527' is visible on the left side and '1833' on the right side of the seal.

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

**vorgelegt von
Joanna Pfeuffer
Schweidnitz/Polen**

Würzburg, 2002

Für meine lieben Eltern
und meinen lieben Sohn

„Zu lohnenden Zielen gibt es keine Abkürzungen“
Beverly Sills

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg unter Anleitung von Herrn Prof.Dr.V.ter Meulen angefertigt.

Danksagung

Ich bedanke mich herzlich bei Herrn Prof.Dr.V.ter Meulen für die Vergabe des Themas und für die großzügige Förderung dieser Arbeit.

Herrn Prof.Dr.J.Tautz danke ich für die Betreuung der Arbeit seitens der Fakultät für Biologie.

Sehr herzlich bedanke ich mich bei Herrn Dr. S. Niewiesk für die Betreuung, Hilfe und Diskussionsbereitschaft und sein ständiges Interesse am Fortgang der Arbeit.

Ein großes Dankeschön an Gerald Weidinger, Karen Püschel, Bernd Schlereth, Iris Schuch, Sabine Gförer, Kay Klapproth, Verena Muthig und Annette Schaubhut, die das Labor 243 mit Leben füllten und mir immer sehr hilfsbereit zur Seite standen.

Allen Mitarbeitern des Institutes für Virologie danke ich für die freundliche und humorvolle Atmosphäre.

Meiner lieben Familie danke ich für Verständnis, Geduld, Unterstützung und Zuversicht zu jeder Zeit. Besonders meiner Mutter danke ich für die vielen Kuchen, die sich im Institut allgemeiner Beliebtheit erfreuten. Meinen Sohn danke ich für seine Geduld während der Anfertigung dieser Arbeit.

Erklärung

Hiermit erkläre ich, daß ich die Dissertation „Untersuchung der Masern-Virus-induzierten Immunsuppression im Baumwollrattenmodell“ selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Weiterhin erkläre ich, daß diese Dissertation noch in keinem anderen Prüfungsverfahren in gleicher oder ähnlicher Form vorgelegen hat.

Ich versichere, daß ich außer den mit dem Zulassungsversuch urkundlich vorgelegten Graden keine weiteren akademische Grade erworben oder zu erwerben versucht habe.

Würzburg,

(Joanna Pfeuffer)

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: Herr Prof. Dr. V. ter Meulen

Gutachter: Herr Prof. Dr. J. Tautz

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Inhaltsverzeichnis

1.	Einleitung	10
1.1.	Masernvirus als Pathogen	10
1.1.1.	Klinik der akuten Masern	11
1.2.1.	Taxonomie des Masernvirus	11
1.2.2.	Virusstruktur und Funktion der Proteine	12
1.2.3.	Rezeptoren für Masernvirus	14
1.3.	Immunsuppression	16
1.3.1.	Klinische Beobachtungen der Immunsuppression	16
1.3.2.	Masernvirus-induzierte <i>in vitro</i> Proliferationsinhibition	18
1.4.	Tiermodelle für eine Masernvirusinfektion	19
1.4.1.	Die Baumwollratte als geeignetes Tiermodell	21
1.5.	Fragestellung	23
2.	Materialien	24
2.1.	Versuchstiere	24
2.2.	Geräte	24
2.3.	Verbrauchsmaterialien	25
2.4.	Medien, Lösungen und Puffer	25
2.5.	Zelllinien	29
2.6.	Virusstämme	29
2.7.	Antikörper	33
2.8.	PCR-Primer	34

3.	Methoden	36
3.1.	Zellkultur	36
3.1.1.	Haltung von permanenten Zelllinien	36
3.1.2.	Haltung von primären Zellen	37
3.2.	Immunologische Methoden	37
3.2.1.	Proliferationstest	37
3.2.2.	Durchflußzytometrie	41
3.2.3.	Antikörper-Produktion	42
3.2.4.	Antikörper-Reinigung	42
3.2.5.	Zytokin-Nachweis mittels RT-PCR	43
3.3.	Virologische Methoden	45
3.3.1.	Zucht von Masernvirus-Impfstämmen	45
3.3.2.	Zucht von Masernvirus-Wildtypstämmen	46
3.3.3.	Plaquetest	46
3.3.4.	TCID ₅₀	47
3.3.5.	Reinigung von MV durch Passagierung in der Baumwollratte	47
3.4.	Tierexperimentelle Methoden	48
3.4.1.	Intranasale Infektion	48
3.4.2.	Organentnahme und Präparation von primären Zellen	48
3.4.2.1.	Lungen-Lavage	48
3.4.2.2.	Milzen	49
3.4.2.3.	Virusrückisolierung aus der Lunge	49
3.4.2.4.	Mediastinale drainierende Lymphknoten	50

4.	Ergebnisse	46
4.1.	Immunsuppressiver Effekt von MV-Wildtypen und Impfstämmen	51
4.1.1.	Vergleich der Proliferationsinhibition nach MV Infektion mit Wildtyp (WTF) und Impfstamm (Edm) in Zellkultur	51
4.1.2.	Vergleich der Induktion einer Proliferationshemmung durch Infektion mit WTF und Edm im Baumwollratten-Modell	52
4.1.2.1.	Ausbreitung und Replikation von WTF und Edm (Viruslast in der Lunge und Virusreplikation in den mediastinalen Lymphknoten) nach Infektion mit WTF und Edm.	55
4.1.3.	Korrelation der Infektionsdosis von WTF mit Proliferationsinhibition und Virusreplikation in drainierenden Lymphknoten	57
4.1.4.	Untersuchungen über Viruspräsenz in drainierenden Lymphknoten sowie Proliferationsinhibition von weiteren MV-Wildtypvirusstämmen	58
4.1.5.	Einfluß auf Immunsuppression und Ausbreitung von unterschiedlich-passagierten Masernvirusstämmen anhand von Proliferationsinhibition, Viruslast in der Lunge und Virusreplikation in drainierenden Lymphknoten	59
4.1.6.	Die Bedeutung der viralen Glykoproteine für die Proliferationshemmung und Virusausbreitung in Baumwollratten	62
4.1.7.	Bedeutung der Punktmutation N481Y im H-Protein von WTF auf die phänotypischen Eigenschaften des Virus	63
4.2.	Rolle der Makrophagen bei der Induktion einer Immunsuppression im Modell der Baumwollratte	65
4.2.1.	Definition der Lungen-Lavage-Makrophagen	66
4.2.2.	Durchflußzytometrische Analyse zur Untersuchung der Expression von F, H und N in Makrophagen aus der Lungen-Lavage MV-infizierten Baumwollratten	68
4.2.3.	Virusreplikation von GFP-MV	69

4.2.4.	Infektion von Makrophagen	70
4.2.5.	<i>In vivo</i> Persistenz von Masernvirus in Makrophagen nach Infektion mit WTF und Edm (Fusion in Zellkultur)	72
4.2.6	Korrelation des immunsuppressiven Effektes nach Infektion mit WTF und Edm	73
4.2.7.	Kinetik der Zytokin-Sekretion von WTF- und Edm-infizierten Makrophagen	75
5.	Diskussion	77
6.	Zusammenfassung	84
6.1.	Summary	87
7.	Abkürzungsverzeichnis	89
8.	Verzeichnis der Abbildungen, Bilder und Tabellen	92
9.	Literaturverzeichnis	94
10.	Veröffentlichungen	108

1. Einleitung

Die akuten Masern sind eine weltweit verbreitete Infektionskrankheit. Erstmals wurden die Masern vor etwa 1000 Jahren erwähnt. Die durch das Masernvirus (MV) ausgelösten akuten Masern zählen zu den zehn häufigsten und zehn tödlichsten Infektionskrankheiten. Trotz Vorhandensein einer Lebendvakzine erkranken jährlich ca. 45 Millionen Menschen an Masern, wobei über eine Million der Fälle tödlich endet (WHO 1997). In Deutschland treten schätzungsweise noch ca. 50.000 – 100.000 Masernerkrankungen pro Jahr auf. Auf etwa 10.000 Masernerkrankungen kommt in Deutschland eine Erkrankung mit tödlichem Ausgang (EPIDEMIOLOGISCHES BULLETIN 1999). Im Unterschied dazu ist die Infektion mit dem Masernvirus in den Entwicklungsländern, vor allem Afrika, die gefährlichste Erkrankung bei Kindern in den ersten Lebensjahren. Der größte Teil der Mortalität ist auf die durch Masern induzierte ausgeprägte Immunsuppression zurückzuführen, die virale, bakterielle und parasitäre Sekundärinfektionen begünstigt.

1.1. Masernvirus als Pathogen

Die Übertragung des Virus erfolgt aerogen als Tröpfcheninfektion (RILEY et al. 1978). Die Eintrittspforte in den Organismus sind Epithelzellen des Respirationstrakts und des Oropharynx. Das Virus repliziert für ca. 2 – 4 Tage lokal in der Mukosa und den drainierenden Lymphknoten und breitet sich dann, z.T. an Leukozyten gebunden, über den Blutstrom aus. Während dieser primären Virämie werden Zellen des mononukleären Phagozytensystems und Zellen lymphoider Organe zur Virusvermehrung bevorzugt (ESOLEN et al. 1993, NAKAYAMA et al. 1995). Eine weitere Vermehrung führt zur sekundären Virämie, in der alle anderen Organe und die Haut besiedelt werden. In der klinisch inapparenten Inkubationszeit sind lediglich eine Leukopenie und multinukleäre Riesenzellen in Schleimhautabstrichen festzustellen.

1.1.1. Klinik der akuten Masern

Die Masern sind eine schwere, hochfieberhafte Erkrankung. Nach einer Inkubationszeit von neun bis zwölf Tagen treten Fieber, Appetitlosigkeit, Abgeschlagenheit und ausgeprägte katarrhalische Symptome wie trockener, bellender Husten, Schnupfen, Konjunktivitis sowie Photophobie und Tränenfluß auf. Etwa drei Tage später kommt es zum Auftreten einer für die akute Masernerkrankung pathognomonischen Veränderung der Mundschleimhaut, den sogenannten Koplikschen Flecken (KOPLIK 1896). Dabei handelt es sich um kleine, kalkspritzerähnliche, festanhaltende Stippchen, die von einem geröteten Hof umgeben sind. Ähnliche Läsionen lassen sich in der gesamten Mukosa des Respirations- und des Gastrointestinaltrakts nachweisen. Einen Tag später verstärken sich die allgemeinen und die katarrhalischen Erscheinungen und es kommt zum Auftreten eines makulopapulösen Exanthems, verursacht durch die Zerstörung MV-infizierter Epithelzellen durch T-Zellen. Das Exanthem beginnt typischerweise im Gesicht und hinter den Ohren und breitet sich innerhalb der nächsten drei Tage langsam über den ganzen Körper aus. Die symptomatische Phase der Erkrankung dauert etwa 10 Tage. Ein Erkrankungsverlauf ohne dieses Exanthem wird als "untypische" oder "weiße" Masern bezeichnet. Komplikationen bei akuten Masern sind: Otitis media, Pneumonie, Diarrhoe und Enzephalitis auf (CLEMENS u. CUTTS 1995).

1.2.1. Taxonomie des Masernvirus

Das Maservirus gehört zur Familie der *Paramyxoviridae*, welche in zwei Unterfamilien *Paramyxovirinae* und *Pneumovirinae* unterteilt wird. Die Familie beinhaltet einige der wichtigsten Krankheitserreger bei Mensch und Tier (Tab. 1.1).

Alle Viren der Gattung *Paramyxovirus* sowie der Gattung *Rubulavirus* besitzen ein Hämagglutinin und eine Neuraminidase. *Rubulaviren* codieren außerdem für ein kleines hydrophobes Protein, das mit der Hüllmembran verbunden ist. Bedeutende Vertreter dieser beiden Gattungen sind z.B. das Murine Parainfluenzavirus 1 (Sendai Virus) oder das Aviäre *Paramyxovirus* 1 (Newcastle Disease Virus). Viren der Gattung *Morbillivirus* besitzen ein Hämagglutinin, aber keine Neuraminidase. Zu dieser Gattung gehören das Masernvirus (MV), das Staupevirus (Canine Distemper Virus, CDV) und

das Rinderpestvirus. Die Vertreter der zweiten Unterfamilie, die Pneumoviren, besitzen wie die Morbilliviren keine Neuraminidase und verfügen anstelle des Hämagglutinins über ein G-Protein, welches allerdings keine hämagglutinierende Aktivität zeigt. Dieser Gattung gehören z.B. die Respiratorischen Syncytialviren (RSV) an, welche Luftwegsinfektionen bei Mensch und Rind verursachen.

Tab. 1.1: Taxonomie wichtiger Vertreter der Familie *Paramyxoviridae*

Unterfamilie	Gattung	Mensch	Tier
<i>Paramyxovirinae</i>	Paramyxovirus	Parainfluenzavirus Typen 1 und 2	Sendai-Virus
	Rubulavirus	Mumpsvirus Parainfluenzavirus Typen 2 und 4	Newcastle-Disease- (Geflügel) Vogelparamyxoviren Typen 2-9
	Morbillivirus	Masernvirus	Hundestaupavirus Rinderpestvirus Staupavirus (Canine Distemper Virus CDV)
<i>Pneumovirinae</i>	Pneumovirus	Respiratorisches Syncytialvirus (RSV)	Respiratorisches Syncytialvirus des (des Rindes)

(aus: Modrow & Falke, *Molekulare Virologie*, 1997)

1.2.2. Virusstruktur und Funktion der Proteine

Das infektiöse Partikel hat einen Durchmesser von ca. 150 – 200 nm. Das virale Genom besteht aus einsträngiger, unsegmentierter RNS von negativer Polarität. Der Ribonukleoproteinkomplex wird aus dem viralen Genom, dem Nukleokapsid-Protein (N-Protein), dem Phospho-Protein (P-Protein) und dem Large-Protein (L-Protein) gebildet (Abb.1.1). Das N-Protein ist die Hauptkomponente des Nukleokapsids, dient dabei als Verpackung der viralen RNS und es schützt vor dem Angriff zellulärer Ribonukleasen. Das L-Protein besitzt die enzymatische Aktivität einer RNS-abhängigen

RNS-Polymerase und ist mit dem P-Protein verbunden. N-, P- und L-Protein bilden zusammen den RNS-Polymerasekomplex, der die Transkription und Replikation der viralen mRNA im Zytoplasma der infizierten Zelle steuert. Die Membranhülle des MV entstammt der Zytoplasmamembran der Wirtszelle. Das Matrix-Protein (M-Protein) verbindet das Nukleokapsid mit der Hüllmembran. In die Membranhülle integriert sind die beiden Glykoproteine Hämagglutinin (H-Protein) und das Fusions-Protein (F-Protein). Beide Proteine bilden Komplexe aus H-Tetrameren und F-Trimeren an der Oberfläche infizierter Zellen. Das H-Protein ist ein Typ II Transmembranprotein, welches die Bindung an den Rezeptor vermittelt (NUSSBAUM et al. 1995). Das M-Protein interagiert mit den zytoplasmatischen Domänen der Glykoproteine und kann die Fusionsaktivität regulieren (RIEDL et al. 2002). Das Typ II Glykoprotein F wird als Vorläuferprotein F₀ synthetisiert und proteolytisch durch die subtilisin-ähnliche Protease Furin im Golgi-Apparat aktiviert. Die entstehenden Untereinheiten F₁ und F₂ sind über eine Disulfidbrücke verbunden. Durch diese Spaltung wird am N-Terminus des F₁-Proteins die hydrophobe Fusionsdomäne freigesetzt (VARSANYI et al. 1985, RICHARDSON et al. 1986). Die erste Konformationsänderung entsteht durch proteolytische Spaltung, die zweite durch die Interaktion von F₁/F₂ mit dem H-Protein. Nach Rezeptorbindung induziert das H-Protein eine Konformationsänderung im F-Protein, die dazu führt, daß die Fusionsdomäne am aminoterminalen Ende des F₁-Proteins in die Wirtszellmembran interkaliert und so die Fusion zwischen Virus und Zellmembran einleitet (LAMB 1993). Dieses Modell unterstützend, konnte gezeigt werden, daß Peptide, welche mit der Insertion der Fusionsdomäne interferieren, die virale Membranfusion verhindern.

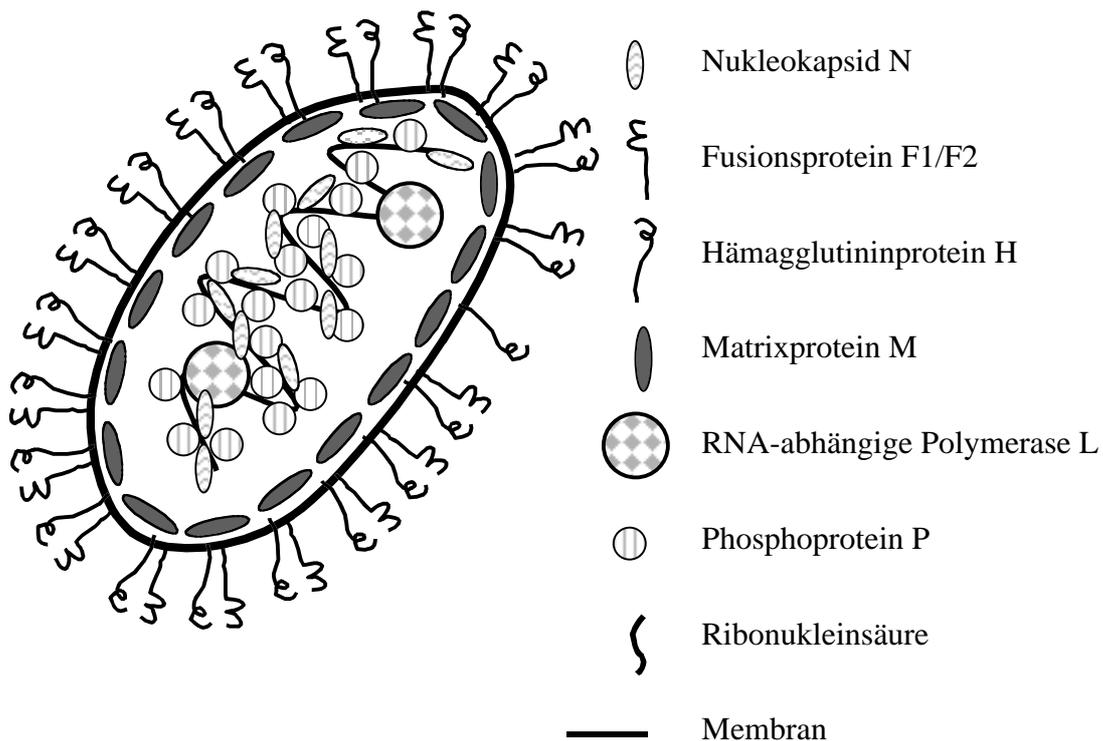


Abb. 1.1: Schematische Struktur eines Masernvirus-Partikels

1.2.3. Rezeptoren für Masernvirus

Das membranständige Kofaktorprotein CD46 (MCP) ist der Hauptrezeptor für MV Vakzinestämme (DOERING et al. 1993, NANIHE et al. 1993). CD46 wird in den meisten humanen kernhaltigen Zellen exprimiert. Das Protein ist ein Typ I Transmembranglykoprotein und gehört zur Genfamilie von Komplementaktivatoren, dessen extrazellulärer Teil aus vier Komplement-Kontrolldomänen (SCR) besteht, stark glykosylierten Serin-Threonin-Prolin-reiche Domänen (STP), einer Transmembrandomäne und einer von zwei alternativen zytoplasmatischen Ankern. CD46 schützt alle Zellen außer Erythrozyten vor Komplementaktivierung, indem es als Kofaktor für den Faktor I wirkt, welcher C3b in die inaktive Form spaltet. Das MV Oberflächenprotein H bindet an die ersten zwei N-terminalen SCR-Domänen I und II.

Die Domänen SCR III und IV scheinen diese Interaktion zu optimieren. Nach Kontakt mit dem H-Protein kommt es zur Herunterregulation von CD46 auf der Oberfläche der infizierten Zelle (SCHNEIDER-SCHAULIES et al. 1995, SCHNEIDER-SCHAULIES et al. 1995). Allerdings konnte durch Einsatz von rekombinanten Edmonston-Viren, welche ein oder beide Glykoproteine von dem Wildtypvirus WTF exprimieren, gezeigt werden, daß diese rekombinanten Viren einen unterschiedlichen Zelltropismus zeigen (JOHNSTON et al. 1999). Dieser veränderte Zelltropismus deutete auf einen weiteren Rezeptor für Wildtypstämme hin, der später als das humane kostimulatorische CD150-Molekül (SLAM: *Signalling Lymphocyte Activation Molecule*) identifiziert wurde (ONO et al. 2001, TATSUO et al. 2000). CD150 ist ein Transmembranglykoprotein I mit zwei extrazellulären Immunglobulin-ähnlichen Domänen. Es wird auf aktivierten T- und B-Zellen, Gedächtniszellen, aktivierten Monozyten und Dendritischen Zellen exprimiert. CD150 wird ebenso wie CD46 infolge der Infektion oder Kontakt mit MV herunterreguliert und könnte für die immunsuppressiven Eigenschaften von MV verantwortlich sein (ERLENHOEFER et al. 2001, HSU et al. 2001). Allerdings können auch Impfstämme mit CD150 interagieren. MV Wildtypstämme interagieren überhaupt nicht mit CD46 oder besitzen nur eine geringe Affinität zu diesem Rezeptor. Die Nutzung von CD46 als Rezeptor für Impfstämme ist vermutlich auf die langen Zellkulturpassagen dieser Viren zurückzuführen (NIELSEN et al. 2001, SHIBAHARA et al. 1994). Die Untersuchung von rekombinanten Viren zeigte, dass die Mutation im WTF H-Protein an Position 481 zum Austausch einer Aminosäure von Asparagin zu Tyrosin (N481Y) führt und damit eine Veränderung in der Rezeptorbenutzung von CD150 zu CD46 verursacht (ERLENHOEFER et al. 2002). Kürzlich wurde gezeigt, daß ein rekombinantes MV Endothelzellen infizieren kann, welche weder CD46 noch CD150 auf der Oberfläche exprimieren (HASHIMOTO et al. 2002). Dieser Befund deutet auf einen weiteren noch unbekanntem dritten Rezeptor hin.

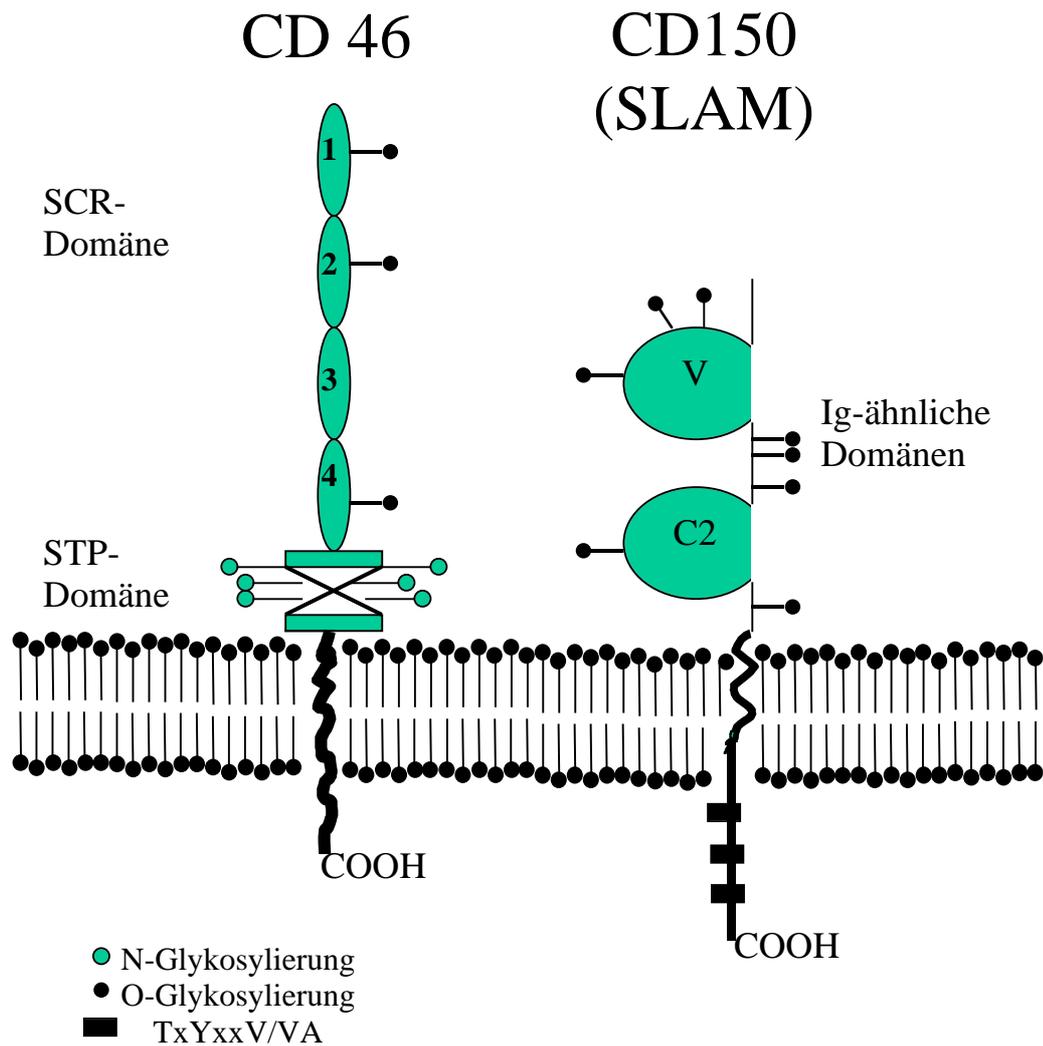


Abb. 1.2: Struktur von MV Rezeptoren CD46 und CD150.

1.3. Immunsuppression

1.3.1. Klinische Beobachtungen der Immunsuppression

Die ausgeprägte Immunsuppression während der MV-Infektion erhöht die Empfänglichkeit von Kindern für opportunistische Infektionen. Während der akuten Infektion haben Patienten eine starke Lymphopenie bei gleich bleibendem CD4/CD8

Quotienten. In der zweiten bis vierten Woche nach Infektion (vom Auftreten der ersten klinischen Symptome bis zum Verblässen des Exanthems) ist die Proliferation von PBL (*ex vivo*) nach Stimulation mit Mitogenen und Antigenen herabgesetzt (GRIFFIN et al. 1995). In dieser Zeit ist die Tuberkulinreaktion negativ (PIRKUET 1908, FIREMAN et al. 1969). Es kann zu einer Reaktivierung von Tuberkulose (TAMASHIRO et al. 1987) und latenten Herpesvirusinfektionen kommen (BLACK et al. 1996). Nach einer überwundenen MV-Infektion können Kinder noch monatelang eine erhöhte Empfänglichkeit für Sekundärinfektionen aufweisen (KATZ et al. 1995). Epidemiologische Studien zeigen eindeutig, dass die Immunsuppressivität von Wildtypviren sehr viel stärker ist als die von Impfstämmen. So treten opportunistische Infektionen nur nach akuten Masern, nicht aber nach Vakzinierung auf. Obwohl man auch nach Impfungen eine Reduktion der Mitogen-stimulierten Proliferation findet, ist diese bei weitem nicht so ausgeprägt. Woran die Unterschiede in der Immunsuppressivität liegen, ist noch unklar. Ein weiteres Merkmal von Wildtypviren ist ihre starke Ausbreitung im gesamten Organismus. Klinisch werden die Koplikschen Flecken, die Beteiligung des oberen und unteren Respirationstraktes, das Exanthem, die Lymphknotenschwellungen, die Veränderungen im Elektroenzephalogramm sowie der MV-Nachweis im Urin als Beleg für die Ausbreitung der Wildtypstämme im Körper angesehen (KATZ et al. 1995).

Während der frühen Phase der Infektion wird eine virusspezifische Th1 Antwort ausgebildet. Mit dem Auftreten des Exanthems werden im Serum von MV-infizierten Patienten erhöhte Titer von löslichem CD4 und Interleukin 4 (IL-4) gefunden, was als Hinweis auf eine Th2 Antwort interpretiert wurde (GRIFFIN et al. 1993). Auch *ex vivo* produzieren PBL von MV-infizierten Patienten nach Mitogenstimulation wenig IL-2, aber viel IL-4. Die Proliferationshemmung von PBL konnte durch die Zugabe IL-4-neutralisierender Antikörper teilweise aufgehoben werden. Da nach MV-Infektion hohe MV-spezifische Antikörpertiter im Serum von Patienten nachweisbar sind und die erhöhten Plasmaspiegel an IL-4 mit der Immunsuppression zeitlich korrelieren, wurde postuliert, daß eine Th2 Antwort mit Sekretion von IL-4 die Ursache für die MV-induzierte Immunsuppression sei (GRIFFIN et al. 1994). Möglicherweise spielt hierbei die Tatsache eine Rolle, dass Makrophagen, die für die Antigenpräsentation wichtig

sind, *in vivo* infiziert sind und dass die Phagozytosefähigkeit während der Infektion herabgesetzt ist (ABRAMOWITZ et al. 1984, ESOLEN et al. 1993, YETGIN u. ALTAY 1980).

1.3.2. Masernvirus-induzierte *in vitro* Proliferationsinhibition

In vitro sind T- wie auch B-Lymphozyten nach Mitogenstimulation gut mit MV infizierbar. Infizierte B- und T-Zellen zeigen nach Mitogenstimulation eine herabgesetzte Proliferation (MCCHESENEY et al. 1987, MCCHESENEY et al. 1988, YANAGI et al. 1992). Diese Proliferationshemmung ist nicht nur auf den zytopathischen Effekt von MV in Zellkultur zurückzuführen, da der Kontakt von infizierten Zellen, die nach UV-Bestrahlung kein Virus mehr freisetzen, und peripheren Blutlymphozyten (PBL) zu einer Proliferationshemmung der nicht-infizierten Zellen nach Mitogengabe führt (SANCHEZ-LEINER et al. 1988, SCHLENDER et al. 1996). Es konnte gezeigt werden, dass die beiden viralen MV Glykoproteine Hämagglutinin (H) und Fusionsprotein (F) diese Proliferationshemmung induzieren (WEIDMANN et al. 2000). So induzieren transfizierte Zellen, die die MV H und F Proteine auf ihrer Oberfläche exprimieren, eine Immunsuppression, während rekombinantes MV, bei dem die beiden masernspezifischen Glykoproteine durch das Glykoprotein des vesikulären Stomatovirus ersetzt wurden, diese Fähigkeit verloren haben (SCHLENDER et al. 1996). Durch diese beiden experimentellen Ansätze konnte eindeutig belegt werden, daß *in vitro* die beiden MV-Glykoproteine notwendig und ausreichend für eine Proliferationshemmung sind.

Von Bedeutung zum Verständnis der Immunsuppression ist jedoch die Beobachtung, daß Lymphozyten nach Infektion oder nach Kontakt mit MV-infizierten Zellen in der G₀/G₁ Phase des Zellzyklus arretiert sind (MCCHESENEY et al. 1987, MCCHESENEY et al. 1988, YANAGI et al. 1992, SCHNORR et al. 1997). Diese Zellen nehmen an Volumen zu, produzieren erhöhte Mengen an Gesamt-RNS und Histon B-RNS, und exprimieren vermehrt MHC Klasse II. Obwohl diese Zellen aktiviert sind, treten im Vergleich zu nicht infizierten Zellen deutlich weniger Zellen in die S- und G₂-Phase ein. Eine wichtige Rolle spielt die Inhibition der Aktivierung der Proteinkinase B/Akt

(AVOTA et al. 2001). Die Wichtigkeit dieses Befundes für die MV-induzierte Immunsuppression wird dadurch unterstützt, daß die Inhibition der Akt-Kinase auch *in vivo* nach MV-Infektion in Baumwollratten beobachtet wurde.

Die durch MV induzierte Immunsuppression hat zur Folge, daß *in vitro* eine Reihe von immunologischen Funktionen von T- und B-Zellen nach MV-Infektion inhibiert sind. Dazu gehören die Generierung von zytotoxischen T-Zellen in einer gemischten Lymphozytenkultur, die Antigen-spezifische Proliferation von T-Zellen und die Sekretion von Antikörpern (BORROW et al. 1995).

Die MV-Infektion hat neben den Auswirkungen auf B- und T-Zellen auch Einfluß auf Makrophagen und Dendritische Zellen (DC). Die Zellen einer Makrophagenlinie zeigen nach *in vitro* Infektion eine erhöhte Sekretion von IL-1 und eine verringerte Sekretion von Tumornekrosefaktor (TNF). Außerdem ist die Expression von MHC-Klasse II Molekülen bei normaler Präsentation von MV-Antigen und gestörter Präsentation von Kontrollantigenen erhöht. In primären Makrophagen führt die abortive Infektion zu einer verringerten Interleukin 12 (IL-12) Sekretion (KARP et al. 1996). Diese Daten könnten die bereits angeführte Hypothese "Th2 Antwort als Ursache der Immunsuppression" unterstützen.

1.4. Tiermodelle für eine Masernvirus Infektion

Affe. Für *in vivo* Untersuchungen zur Pathogenese von MV-Infektionen sind Affen ein geeignetes Tiermodell, weil sie nach MV-Infektion eine dem Menschen ähnliche Erkrankung entwickeln (VAN BINNENDIJK et al. 1994, KOBUNE et al. 1996)

Das Affenmodell ist bislang vorwiegend für die Untersuchung von Impfstoffen (VAN BINNENDIJK et al. 1994, ZHU et al. 1997) und der Pathogenese der atypischen Masern (POLACK et al. 1999) eingesetzt worden. Allerdings ist der Einsatz von Affen für die MV-Forschung wegen der hohen Kosten, des Fehlens von Inzuchtieren, des geringen Angebots an Tieren bei hoher Nachfrage sowie aus ethischen Gründen beschränkt.

Nagetiermodelle. In Nagetieren wie Hamster (BURNSTEIN et al. 1963), Maus (GRIFFIN et al. 1974) oder Ratte (LIEBERT et al. 1987) kann nur nach intrazerebraler Inokulation mit einem neurotrophen MV eine Enzephalitis induziert werden. Alle anderen Applikationsarten führen nicht zu einer Infektion und die Infektion des ZNS breitet sich nicht in die Peripherie aus. Offensichtlich können Zellen des ZNS dieser Nagetiere über einen bislang nicht identifizierten Rezeptor *in vivo* infiziert werden.

CD46-transgene Nagetiere. Da die Expression des humanen CD46 Moleküls als Rezeptor für den MV-Impfstamm Edmonston (siehe Abb.1.2.) in gewissen Nagetierzellen zu einer erhöhten Suszeptibilität für diesen Virusstamm führte, wurde von verschiedenen Arbeitsgruppen versucht, CD46-transgene Ratten und Mäuse für MV-Versuche einzusetzen.

CD46-transgene Ratte. MV löst in Ratten eine Enzephalitis ohne Virusreplikation in der Peripherie aus (LIEBERT et al. 1987). Humanes CD46 verbessert zwar die Aufnahme von MV in Rattenzellen, aber ein intrazellulärer Block unterbindet die Replikation (NIEWIESK et al. 1997). In den CD46-transgenen Ratten konnte weder nach intratrachealer noch nach intraperitonealer Infektion mit MV eine Immunsuppression induziert werden (Niewiesk, unveröffentlicht).

CD46-transgene Mäuse. Untersuchungen von verschiedenen Arbeitsgruppen mit CD46-transgenen Mäusen zeigten, dass die Replikation vom MV-Impfstamm im Gehirn dieser Tiere ermöglicht wurde, während ein intrazellulärer Block in der Replikation eine Infektion in peripheren Organen verhinderte. (HORVAT et al. 1996, RALL et al. 1997, MRKIC et al. 1998, BLIXENKRONE-MÖLLER et al. 1998). Im Gegensatz dazu wurde kürzlich berichtet, dass eine CD46-transgene Maus für Immunsuppressionsstudien eingesetzt werden kann (OLDSTONE et al. 1999).

SCID-Mäuse. In publizierten Studien wurde versucht, SCID-hu Mäuse (AUWAERTER et al. 1996, TISHON et al. 1996) als Tiermodell einzusetzen. In SCID Mäusen, die mit humanem fetalem Thymus transplantiert worden waren, führt die

Infektion mit MV des Thymusepithels zur Apoptose von Thymozyten (AUWAERTER et al. 1996). Die MV Infektion von SCID-Mäusen, die Antikörper sezernierende humane B-Zellen erhalten haben, inhibiert die Antikörpersekretion (TISHON et al. 1996).

All diesen Nagetiermodellen ist gemeinsam, daß eine intranasale Infektion nicht zur Virusreplikation und Ausbreitung im Respirationstrakt führt und sie deshalb nur sehr selektiv für Pathogenesestudien einer MV-Infektion eingesetzt werden können.

1.4.1. Die Baumwollratte als geeignetes Tiermodell

Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) sind für eine Anzahl von Viren empfänglich, die im Menschen Erkrankungen des Respirationstraktes auslösen. Das am besten untersuchte Virus in diesem Modell ist das respiratorische Synzytialvirus (BYRD et al. 1997). Darüber hinaus sind Baumwollratten empfänglich für Influenza-, Parainfluenza- und Adenoviren (FAITH et al. 1997). Baumwollratten sind die einzigen Nagetiere, in denen eine intranasale Infektion mit Masernvirus zur Replikation im Respirationstrakt führt. Die Masernvirus-Infektion von Impfstämmen verläuft in Baumwollratten klinisch unauffällig. Die Tiere zeigen reduzierte Aktivität, aber ihr Fluchtreflex ist voll ausgeprägt und es tritt kein Gewichtsverlust auf. Histologisch ist eine atypische Pneumonie mit interstitiellen Infiltraten zu beobachten. Um die Infiltrate herum sind in Gefrierschnitten masern-positive Zellen nachweisbar. Die das Lumen der Bronchien und Alveolen säumenden Epithelzellen werden durch die Infektion zerstört. Nach der intranasalen Infektion mit einem Impfstamm repliziert das Masernvirus mit höchsten Titern an Tag 4 und 5 bis zu 10 Tage im Lungengewebe von Baumwollratten (NIEWIESK et al. 1997). Aus anderen Organen kann mit Hilfe der PCR zwar virale RNS aber durch Kokultivation kein infektiöses Virus nachgewiesen werden. Milzzellen von infizierten Baumwollratten zeigen von Tag 3 bis Tag 7 nach Infektion eine reduzierte Proliferation nach Mitogenstimulation, die am Tag 4 am ausgeprägtesten ist. Mit abnehmendem Virustiter des Inokulums nimmt auch die Proliferationshemmung ab

(NIEWIESK et al. 1997). Die Proliferationshemmung ist sowohl nach Stimulation mit T- wie auch B-Zellmitogenen zu sehen, d. h. es scheinen beide Lymphozytenpopulationen betroffen zu sein. Baumwollratten entwickeln innerhalb von einer Woche nach Infektion im ELISA und Neutralisationstest nachweisbare B-Zellantworten. Die Antikörpertiter steigen bis zu 4 Wochen nach der Infektion an. Bereits nach einer Woche sind Baumwollratten gegen Reinfektion mit Masernvirus geschützt.

Diese eingehenden Studien zeigten deutlich, daß die Baumwollratte als Modell zur Untersuchung von MV-Infektionen geeignet ist. Interessanterweise konnten die Baumwollratten auch mit klinischen Isolaten intranasal infiziert werden. Der Vergleich zwischen Wildtypen und Impfstämmen zeigte, dass Wildtypviren in Baumwollratten replizieren können und sich stärker als Impfstämme in die Peripherie ausbreiten (WYDE et al. 1999).



Bild. 1.1: *Sigmodon hispidus*

1.5. Fragestellung

In vorliegender Arbeit sollte untersucht werden, ob die beim Menschen seit langem bekannten Unterschiede in der Immunantwort zwischen Vakzinierung und Wildtypinfektion auch in der Baumwollratte auftreten. Da Baumwollratten ein wissenschaftlich sehr interessantes Modellsystem für Masernvirus-Infektion sind, sollen (1) nach der intranasalen Infektion mögliche Unterschiede von Virusausbreitung und Proliferationsinhibition zwischen Wildtypen und Impfstämmen ermittelt werden. Da Impfstämme ursprünglich von einem Wildtyp durch Passagierung abgeleitet wurden, sollte die Rolle unterschiedlich passagierter Wildtypen und Impfstämme untersucht werden. Da es bei der Passagierung zu einer veränderten Rezeptorbenutzung von CD150 auf CD46 kommt sollen daher unterschiedlich passagierte Wildtypen und Impfstämme eingesetzt werden, um die veränderte Rezeptorbenutzung auch in der Baumwollratte zu analysieren. Außerdem ist in Zellkulturexperimenten gezeigt worden, dass die Proliferationsinhibition der T-Zellen durch die MV Oberflächenproteine H und F vermittelt wird. Deshalb werden rekombinante Masernviren verwendet, bei denen im Hintergrund von Edm-NSE H und F gegen die WTF Glykoproteine ausgetauscht wurden. Hiermit soll gezeigt werden, ob diese Proteine bzw. welche der beiden Proteine für die Virusausbreitung und Proliferationsinhibition entscheidend sind.

Da Makrophagen virales Antigen phagozytieren und präsentieren, sollte (2) untersucht werden, ob MV in Makrophagen der Baumwollratte replizieren kann. Desweiteren sollte ermittelt werden, ob die Präsentation von MV Glykoproteinen auf der Oberfläche der Makrophagen Einfluß auf die T-Zell-Proliferation hat und ob Wildtypen und Impfstämme einen unterschiedlichen proliferativen Effekt zeigen. Abschließend wird die Sekretion von Zytokinen in Wildtyp- und Impfstamm-infizierten Makrophagen untersucht.

2. Materialien

2.1. Versuchstiere

Der Baumwollratten-Inzuchtstamm Cotton/Nico wurde von der Firma IFFA Credo (Lyon, Frankreich) bezogen. Die Zuchtkolonie des Instituts für Virologie und Immunbiologie (Würzburg) wird regelmäßig durch neue Zuchtpaare ergänzt. Die Tiere werden innerhalb eines Barriersystems bei einer Raumtemperatur von $22\pm 2^{\circ}\text{C}$, einer Luftfeuchtigkeit von $55 \pm 5 \%$ und einem Licht-Dunkel-Rhythmus von 12 Stunden gehalten. Infizierte Tiere wurden in Isolatoren innerhalb des Barriersystems untergebracht. Nach dem Absetzen im Alter von 6 Wochen wurden die Jungtiere nach Geschlecht getrennt und in Gruppen bis zu maximal 5 Tieren gehalten. Männliche Tiere wurden ab einem Alter von 8 Wochen alleine gehalten, um Bißverletzungen zu vermeiden. Baumwollratten lassen sich nicht mit der Hand anfassen, eine spezielle Faßzange ist erforderlich (Niewiesk et al. 1997). Um den Streß für das Tier so gering wie möglich zu halten, werden Manipulationen unter Ethernarkose durchgeführt.

2.2. Geräte

- Autoklaven, MM München
- Brutschrank, Heraeus
- Durchflußzytometer (FACScan), Becton & Dickinson
- Eismaschine, Scotsman AF 10
- Elektrophoreseapparatur und Zubehör, institutseigene Werkstatt
- Ethernarkosegefäß
- Fluoreszenzmikroskop mit Kameraaufsatz (Leica)
- Harvester Automach 2000, Dynatech
- Heizblock, Liebisch
- Laborwaage, Sartorius
- Magnetrührer, GLW
- Mikroskop, Leitz
- Mikrowelle, Brother Powerwave
- Netzgerät E554, Consort

-
- PCR Gerät, Peltier Thermal Cycler PTC-200
 - pH-Meter, WTW
 - Pipetten, Gilson
 - Rotator, Heidolph
 - Rotoren SS34, JA20, GS3 (Sorvall, Beckmann)
 - Spektralphotometer Ultrospec plus, LKB
 - sterile Arbeitsbank, Gelaire, Flow Laboratories
 - Szintillationszähler, Beckmann
 - UV-Detektor, Vilber Lourmat
 - Videoprint-Anlage, Mitsubishi Video Copy Processor
 - Wasserbad, GFL
 - Zentrifugen: Eppendorf 5417C, Hettich Rotanta/K, Sorvall RC 5B, Rotor HB-4, GSA, GS-3

2.3. Verbrauchsmaterial

Die Chemikalien wurden von den Firmen BioRad, Böhringer, Gibco, Merk, Pharmacia, Perkin Elmer, Promega, Roth, Serva und Sigma bezogen.

Die Antikörper wurden von den Firmen, Dako, Dianova, Hölzel Diagnostika, Pharmingen und Virion System bezogen.

Radioaktiv markierte Substanzen stammten von den Firma Amersham.

Steriles Einwegmaterial wurde von den Firmen Eppendorf, Falcon und Greiner geliefert. Glaswaren und Operationsbesteck wurde von der Firma Hartenstein erworben.

Versuchstiere wurden von der Firma Iffa Credo bezogen.

2.4. Medien, Lösungen und Puffer

Zellkultur

Medien für Suspensionszellen:

Waschpuffer:

PBS (hauseigene Medienküche),
0,1 % FKS (Gibco)

Standard-Zellkulturmedium

(RPMI komplett, 10 % FKS): RPMI 1640 (Gibco), 2 mM Glutamin, 1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren (Gibco), 1 % (v/v) Na-Pyruvat (Gibco), 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % FKS

Einfriermedium: FKS, 10 % DMSO (Merck)

Medien für Hybridoma-Zellen:

RPMI 1640, 2 mM Glutamin, 1 % (v/v), nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % (v/v) Na-Pyruvat, 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 10 % Myoklon (*Myoclone SuperPlus*, Gibco), 2 % HAT (Sigma), IL-2-haltiger Überstand

Medien für adhärente Zellen

Verozell-Medium: MEM (Hauseigene Medienküche), 100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml Streptomycin, 5% FKS

ATV: 0,8 % (w/v) NaCl, 0,04 % (w/v) KCl, 0,1 % (w/v) D-Glukose, 0,058 % (w/v) NaHCO₃, 0,05 % (w/v) Trypsin, 0,02 % (w/v) EDTA

Medien für die Viruszucht in Verozellen

Verozell-Medium: 500 ml DMEM (Hauseigene Medienküche),
2 mM Glutamin,
1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren,
1 % (v/v) Na-Pyruvat, 100 IE/ml Penicillin,
100 µg/ml Streptomycin, 2 % FKS

Medien für die Viruszucht in BJAB-Zellen:

RPMI 1640 (Gibco), 2 mM Glutamin,
1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren
(Gibco), 1 % (v/v) Na-Pyruvat (Gibco),
100 IE/ml Penicillin, 100 µg/ml
Streptomycin, 2 % FKS

Affinitätschromatographie**Protein G Sepharose (4 Fast Flow, Amersham Pharmacia)**

Bindungspuffer: 20 mM NaH₂PO₄, pH 7.4

Elutionspuffer: 0,1M Glycin-HCl , pH 2.7

Neutralisationspuffer: 1 M Tris-HCl , pH 8.6

Immunfärbung in der Durchflußzytometrie

FACS-Puffer: PBS, 0,1 % BSA (Sigma), 0,02 % NaN₃

Antikörperverdünnungspuffer :	PBS, 0,1 % BSA, 0,02 % NaN_3 , 10 % FKS (bzw. 10 % Baumwoll- rattenserum)
Proliferationstest	
Zellkulturmedium:	RPMI 1640, 2 mM Glutamin, 1 % (v/v) nicht-essentielle Aminosäuren, 1 % (v/v) Na-Pyruvat, 100 IE/ml Penicillin, 100 $\mu\text{g/ml}$ Streptomycin, 2 % Baumwollrattenserum
Plaquetest	
Top-Agar:	7,5 ml 2 % Agar, 7,5 ml doppelt konzentriertes MEM, 5 ml MEM, 5 % FKS
Neutralrot-Stammlösung:	0,017 % Neutralrot
Gebrauchslösung:	Stamm 1:100 in PBS verdünnt
Lungenlavage	
	PBS, 0,1% EDTA, 10% Hitze-inaktiviertes FKS

2.5. Zelllinien

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

Tab.2.1: Zelllinien

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
BJAB	lymphoblastoide B-Zelllinie	Human; (Menezes et al., 1975)
B95a	semiadhärenter Subklon der EBV-transformierten B-Zelllinie B95	Krallenaaffe (<i>Callithrix jacchus</i>); ATCC
CR-T2	Hybridoma-T-Zelllinie	Baumwollratten-Maus; Institut für Virologie, Universität Würzburg
Verozellen	Nierenfibroblastenzelllinie	afrikanische Grüne Meerkatzen (<i>Cercopithecus aethiops</i>); ATCC

2.6. Virusstämme

Alle Viren waren im Institut vorhanden und entsprechend den unter Abs. 3.3 aufgeführten Bedingungen propagiert und gelagert. Außerdem wurden alle Virusstämme und ihre Stammherkunft, Zucht und Literatur in Tabelle 2.2 aufgelistet.

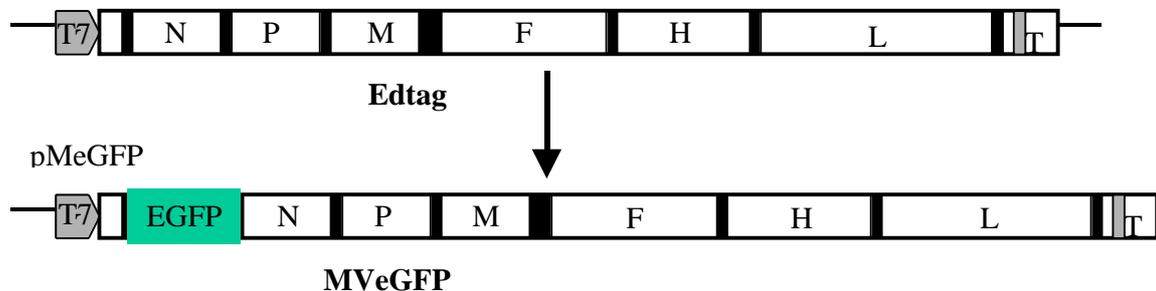
Tab.2.2: Virusstämme

Virusstämme	Herkunft	Zucht	Literatur
Edm-B	Edmonston B Impfstamm/60	Vero	(ALKHATIB et al. 1986)
Edm-NSE	(1999)	Vero	(SINGH et al. 1999)
Edm(wt)	Edmonston Wildtyp.USA/54	Vero	(ROTA et al. 1994)
Edm (WTF H)	(1999)	BJAB	(JOHNSTON et al. 1999)
Edm (WTF F)	(1999)	BJAB	(JOHNSTON et al. 1999)
Edm (WTF H+F)	(1999)	BJAB	(JOHNSTON et al. 1999)
Edm (WTF H) Y481N	(1997)	Vero	(ERLENHOEFER et al. 2002)
BIL	Bilthoven.NID/92	BJAB	(AUWAERTER et al. 1999, RIMA et al. 1997)
WTFb	Erlangen/90	BJAB	(RIMA et al. 1997)
WTFv	Erlangen/90	Vero	(RIMA et al. 1997)
ICB	Ichinose.JAP/84/1	BJAB	(KOBUNE et at. 1996)
MVeGFP	(2000)	Vero	(DUPREX et al. 2000)

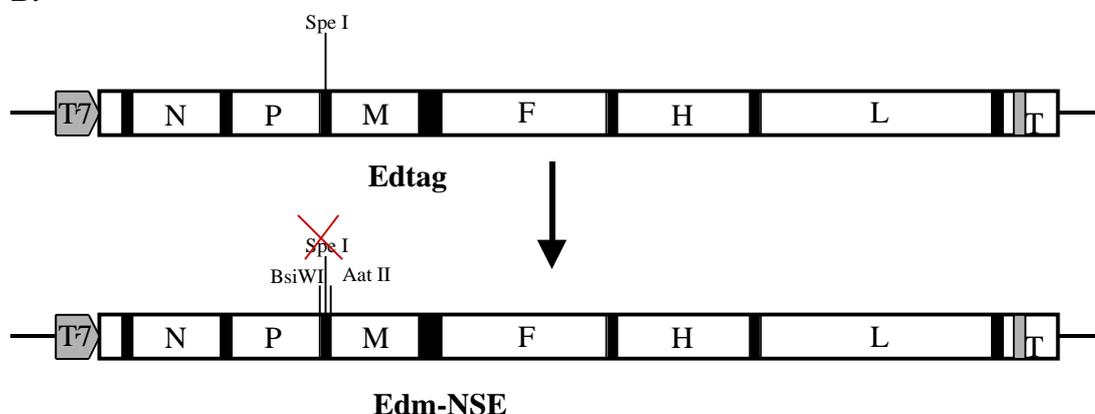
Zwei Wildtypstämme, Bilthoven und ICB, wurden ausgewählt, weil diese akute Masern in Resus-Affen und Javanaaffen verursachten. Edm(wt) wurde von NIH durch Lee Martin, Zürich, Schweiz, erhalten. Das Virus ist ein klinisches Isolat und wurde nach 13 Passagen in Baumwollratte getestet. Das Edm-WT2+3 Virus wurde zusätzlich zwei mal durch die Baumwollratte und drei mal durch BJAB Zellen passagiert. Wildtyp Fleckenstein WTF wurde in Erlangen isoliert und in verschiedene Zelltypen passagiert. WTFv wurde in Vero Zellen und WTFb in BJAB Zellen passagiert. Edm-B ist ein erstmals in den USA zugelassener Impfstamm.

Die Genomstruktur der rekombinanten Viren ist in Abbildung 2.1. schematisch dargestellt. Edtag ist ein molekularer Klon von Edm-B. MVeGFP ist ein von Edtag abgeleiteter Virus mit zusätzlichem GFP Gen an erster Stelle (Abb. 2.1.A). Edm-NSE ist ein von Edtag abgeleiteter Virus mit zusätzlich eingefügten Schnittstellen (Abb. 2.1.B). Auf dem Hintergrund von Edm-NSE wurden die rekombinanten Viren hergestellt (Abb. 2.1.C,D,E,F).

A.
p(+)⁺MV



B.



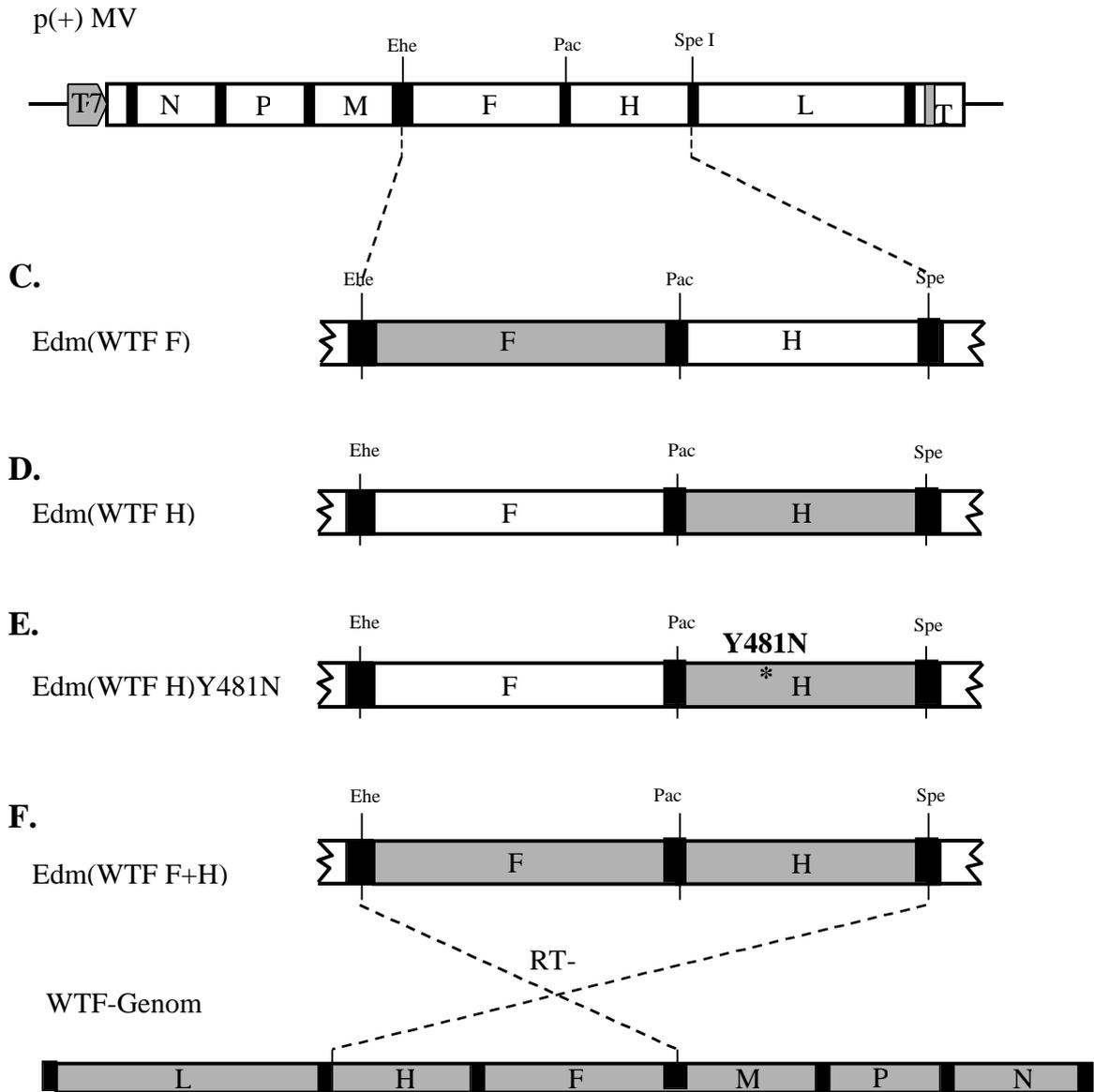


Abb.2.1. Überblick über die Genomstruktur der eingesetzten rekombinanten Masernviren basieren auf dem Vakzinestamm Edmonston-B.

Angegeben sind die einzelnen ORFs in den jeweiligen Genomen, sowie die einzelnen Genprodukten des P-ORF. Schwarzen Boxen entsprechen nicht-translatierten 5, und 3, Regionen. (A) MVeGFP, (B) Edm-NSE, (C) Edm.(WTF F), (D) Edm(WTF H), (E) Edm(WTF H) Y481N, (F) Edm(WTF H+F)

2.7. Antikörper

Die Hybridoma aller verwendeten monoklonalen Antikörper gegen MV-Antigene wurden von Frau S Löffler, Institut für Virologie hergestellt.

Tab.2.3: Antikörper

Antikörper	Herkunft	Bemerkung
W6/32	(BARNSTABLE et al. 1978)	humaner MHC I-Antikörper
13-4	(HÄMMERLING et al. 1979)	Maus-MHC II-Antikörper
13/42	Virologie, Würzburg	humaner CD46-Antikörper
A 504	Virologie, Würzburg	MV-Fusionsprotein
L 77	Virologie, Würzburg	MV-Hämagglutinin
F 227	Virologie, Würzburg	MV-Nukleokapsid
B 14	Virologie, Würzburg	humaner CD95-Antikörper
Antiseren	Herkunft	Bemerkung
FITC-Esel-anti-Maus-IgG	Dianova	Fluoreszeinisothiocyanat-gekoppelt
FITC-Ziege-anti Maus-IgG	Dianova	Fluoreszeinisothiocyanat-gekoppelt

2.8. PCR-Primer.

Alle PCR-Primer für die Kinetik der Zytokin-Sekretion von MV-infizierten Makrophagen wurden von Invitrogen, Deutschland bezogen.

Tab.2.4: PCR-Primer.

Zytokine	PCR Produkt (in bp)	Vorwärtsprimer	Rückwärtsprimer
		5'->3'	5'->3'
IL1α	380	ATAAGTCTCCAGGGCA CAGA	ACCATGGGTTATGGCCT CCA
IL1β	624	ACCATGGGTTATGGCC TCCA	GGAAGGCATTAGAACC GCTCCAGCC
IL6	210	TCTTGGGACTGATGCT GGTG	ATGCATCATCATGGGTC ATAC
IL18	538	AATGACGTTTATTGAC AACACG	TTGAGGTAAGTTAGTAA CAGTG
IL12p35	519	AGCATGTGTTTCATCGC GCTG	GAGTCTCACCATTGAGA TTCA
IL12p40	499	ATGCATCATCATGGGT CATAC	TGCTCTTGAGGCTAAAC TTC
MIP1α	260	CTACGGCTGTCCTTGC TGTT	CAGCTCCAGGTCAGTGA
MIP1β	455	CGATAGTAAGCCATGA	TGACCCCTATCCACACC AGT
MIP2	188	TCAGCGATGCTGTTGC TGCT	TTGAGAGTGGCTATGAC TTC
TNFα	290	ATGAGCACGGAAAGC ATGATC	CTACGACGTGGGCTACG GGCT
RANTES	296	AGCAGCAAATGCTCCA ACTT	CCAGGCTCTGAAGAGG ACAC

IP10	531	AACCAGAGAGAAGCC GATCA	CGATAGTAAGCCATGA
Gro	232	CAGGGGTTCACTTCAA GAAC	GGTGTTTCAGAAGCCAG CAT
GAPDH	520	CTCAGTGTAGCC CAGGATGC	ACCACCATGGAGAAG GCTGG

3. Methoden

3.1. Zellkultur

3.1.1. Haltung von permanenten Zelllinien

Haltung von Vero-Zellen

Vero-Zellen wurden in MEM/5% FKS kultiviert, zweimal pro Woche mit 10 ml 37°C warmem ATV von der Kulturflasche abgelöst, in frischem Medium resuspendiert und 1:5 verdünnt und wieder in Kulturflaschen ausgesät.

Haltung von BJAB-Zellen

BJAB wurden in RPMI (komplett)/10% FKS kultiviert und zweimal pro Woche 1:10 geteilt.

Haltung von B95a-Zellen

B95a-Zellen wurden in RPMI (komplett)/10% FKS kultiviert und einmal pro Woche mit einem Zellschaber von der Kulturflasche abgelöst, und 1:10 geteilt.

Haltung von B14-Hybridoma-Zellen

B14-Zellen wurden in DMEM (komplett)/5% FKS kultiviert und in Abständen von 3-4 Tagen 1:10 geteilt.

Haltung von CR-T2-Hybridoma-Zellen

CR-T2-Zellen wurden in RPMI (komplett)/10% FKS, IL2 und HAT kultiviert und in Abständen von 3-4 Tagen 1:10 geteilt.

3.1.2. Haltung von primären Zellen

Haltung von primären Makrophagen aus der Baumwollratte

Isolierte primäre Makrophagen wurden in MEM mit 20% FKS und Glutamin kultiviert.

Einfrieren und Auftauen von Zellen

Durch Einfrieren in flüssigem Stickstoff können Zellen über längere Zeit gelagert werden. Die Zellen wurden gezählt und in einer Zelldichte von 1×10^6 Zellen/ml in FKS/10 % DMSO resuspendiert. 1 ml Aliquots wurden zunächst 1h bei -20°C und danach über Nacht bei -80°C eingefroren. Anschließend wurden die Aliquots in flüssigen Stickstoff überführt. Für die Rekultivierung eingefrorener Zellen wurden diese schnell im Wasserbad aufgetaut und sofort in 10 ml des entsprechenden Mediums aufgenommen. Nach Zentrifugation bei 1000 rpm, 10 min und 15°C wurde der DMSO-haltige Überstand entfernt, nochmals mit 10 ml Zellkulturmedium/10 % FCS gewaschen und die Zellen in neuem Medium zunächst in einer 50 ml Kulturflasche kultiviert.

3.2. Immunologische Methoden

3.2.1. Proliferationstest

Proliferationstest von Milzzellen

Mit Hilfe des Proliferationstestes wurde die T-Zell-Proliferation gemessen. Dafür wurden Milzzellen MV-infizierter Tiere in Triplikat in Gegenwart von Concavalin A und zur Kontrolle ohne Concavalin A ausplatiert. Die Proliferation wird anhand des Einbaus radioaktiv-markierten Thymidins in neusynthetisierte DNS gemessen. Die Proliferation von T-Zellen von nicht-infizierten Tieren wurde mit MV-infizierten Tieren verglichen. Die Milzzellen wurden in einer Zelldichte von 5×10^5 -Zellen in Zellkultur-

Platten mit Flachboden (96 Vertiefungen) ausgesät. Concavalin A wurde in einer Endkonzentration von 2.5 µg/ml zugefügt. Die Platten wurden bei 37°C im Brutschrank für 2 Tage kultiviert. Danach wurde 0.5 µCi ³H-Thymidin pro Vertiefung in einem Volumen von 25 µl hinzugefügt. 16-20 Stunden später wurden die Zellen mit einem Harvester gesaugt. Das in die DNS eingebaute ³H-Thymidin verblieb somit im Filter und freie Radioaktivität wurde gewaschen. Die Filtermatte wurde anschließend in eine Folientüte gesteckt, 10 ml Szintillationsflüssigkeit dazugegeben und gleichmäßig verteilt. Um ein Auslaufen der Flüssigkeit zu verhindern wurde die Folie zugeschweißt. Der Einbau radioaktiv-markierten Thymidins wurde in einem β-Szintillationszähler in Zerfällen pro min gemessen. Als Parameter für die Stimulation der CD4-positiven T-Zellen wurde der Stimulationsindex berechnet, indem man die Proliferation der Zellen, die in Gegenwart von Concavalin A gewachsen sind, durch die Proliferation der Zellen ohne Stimulanz (Mediumkontrolle) teilt.

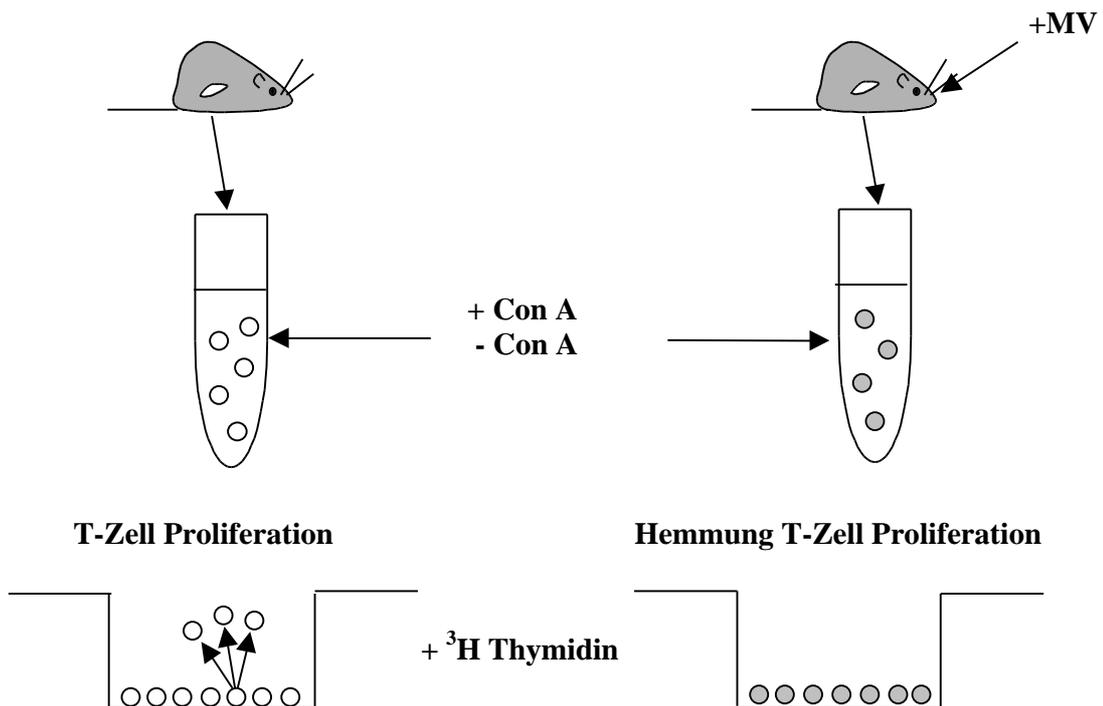


Abb. 3.1. Schematische Darstellung von Proliferationstest der Milzzellen

Milzzellen von MV-infizierter und nichtinfizierter Baumwollratten wurden mit oder ohne Concavalin A bei 37°C kultiviert. 16-20 Stunden vor der Ernte wurde ³H-Thymidin hinzugegeben. Proliferation der Zellen wurde durch den Einbau radioaktiv-markierten Thymidins gemessen.

Proliferationstest mit CR-T2-Zellen

Zur Untersuchung der MV-Infektion *in vitro* wurden die CR-T2-Zellen mit nicht-infizierten Milzen in verschiedenen Verhältnissen kokultiviert. Um die Proliferation der CR-T2-Zellen zu vermeiden wurden die Zellen mit 1 J/cm^2 UV-bestrahlt. Die Expression der viralen Proteine H und F wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie überprüft. Danach wurde der Proliferationstest wie oben beschrieben durchgeführt.

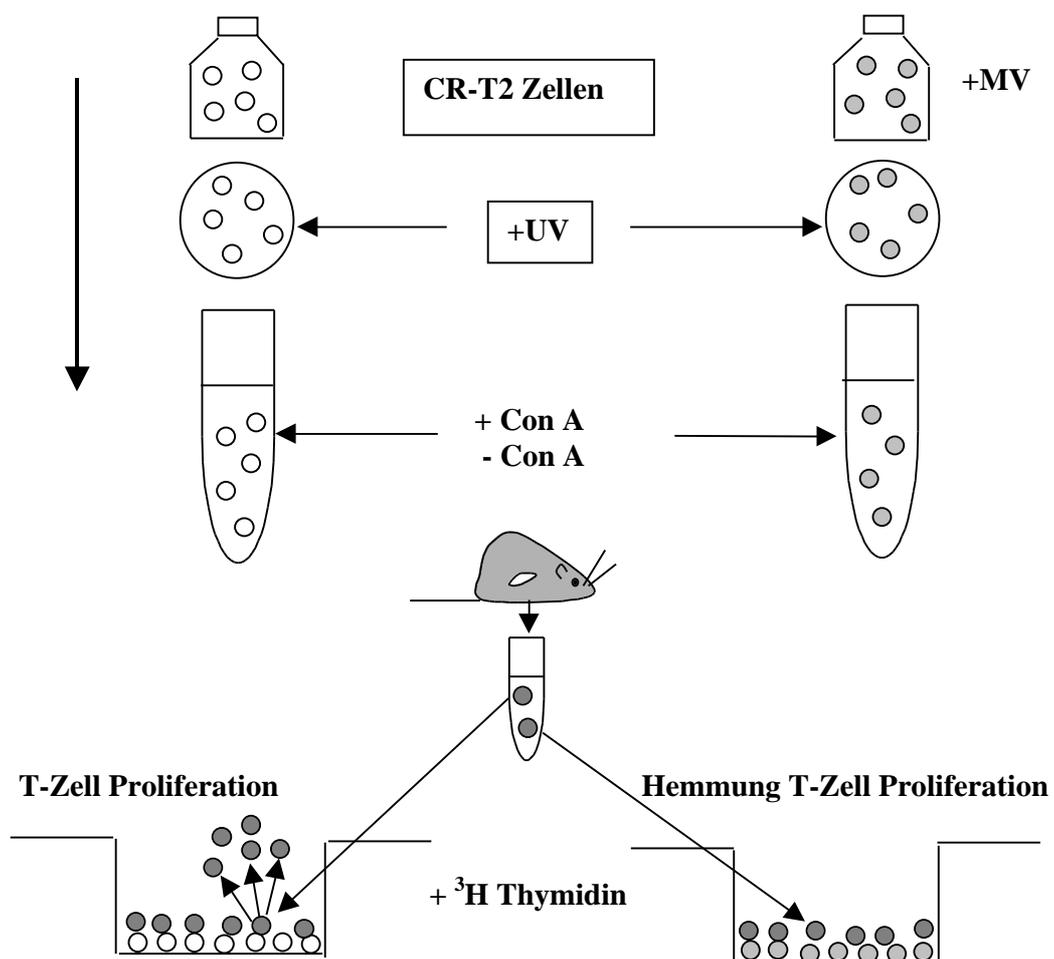


Abb. 3.2. Schematische Darstellung von Proliferationstest mit CR-T2-Zellen

CR-T2-Zellen wurden mit MV infiziert wie auch ohne Infizierung, UV bestrahlt, in Anwesenheit und Abwesenheit Concanavalin A in verschiedenen Verhältnissen mit nichtinfizierten Baumwollratten Milzzellen kokultiviert. 16-20 Stunden vor der Ernte wurde ^3H -Thymidin hinzugegeben. Proliferation der Zellen wurde durch den Einbau radioaktiv-markierten Thymidins gemessen.

Proliferationstest mit infizierten Makrophagen

Die Tiere wurden intranasal mit WTF und Edm infiziert und die Lungen-Lavage-Makrophagen wurden UV-bestrahlt (0.5 J/cm^2). Die Expression der viralen Protein H und F wurde mit Hilfe der Durchflußzytometrie überprüft. Danach wurden die so behandelten Makrophagen in verschiedenen Konzentrationen mit naiven Milzzellen kultiviert und der Proliferationstest gemäß obiger Beschreibung durchgeführt.

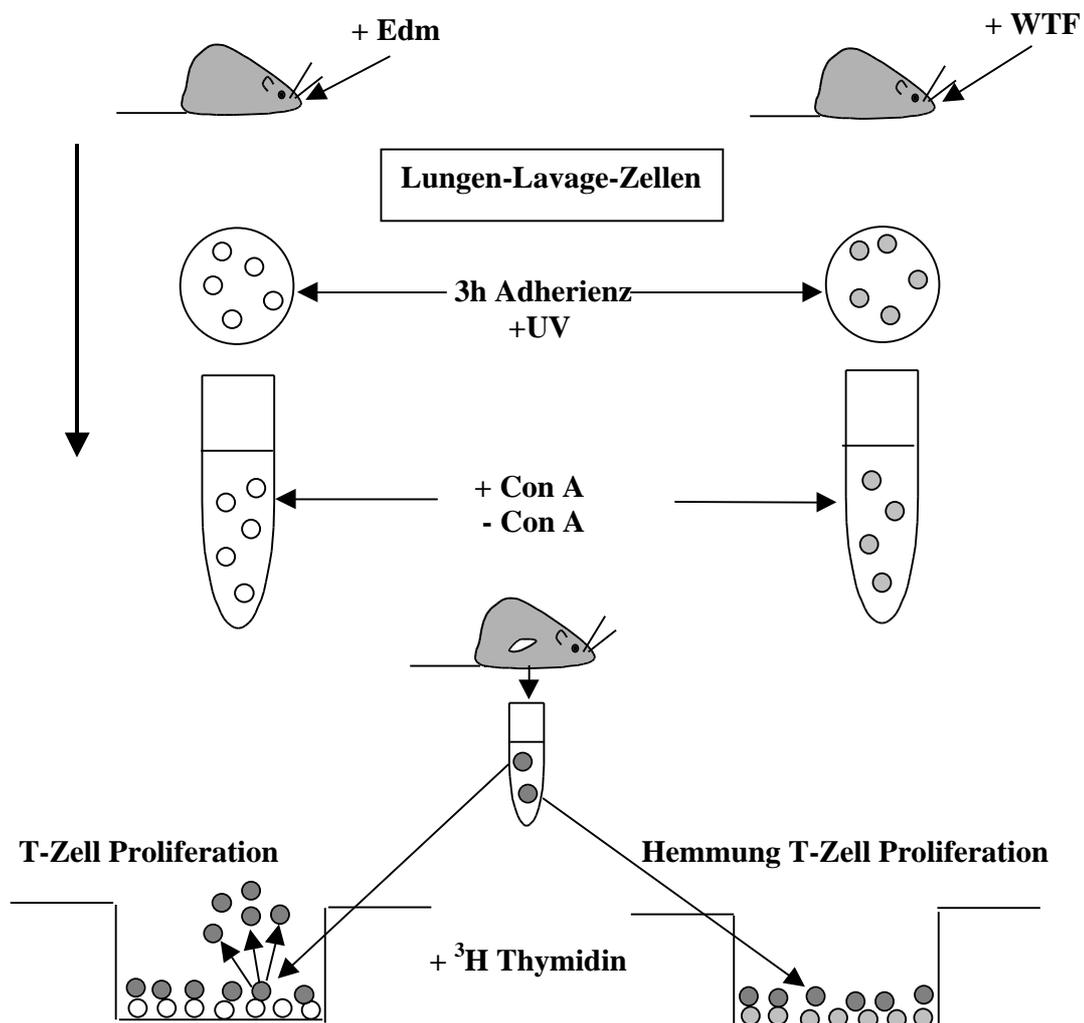


Abb. 3.3. Schematische Darstellung von Proliferationstest mit in vivo infizierten Makrophagen

Nach intranasaler Infektion mit MV Lungen-Lavage-Zellen wurden 3 Stunden adheirert, danach UV bestrahlt und in Anwesenheit und Abwesenheit Concavalin A in verschiedenen Verhältnissen mit nichtinfizierten Baumwollratten Milzzellen kokultiviert. 16-20 Stunden vor der Ernte wurde ^3H -Thymidin

hinzugegeben. Proliferation der Zellen wurde durch den Einbau radioaktiv-markierten Thymidins gemessen.

3.2.2. Durchflußzytometrie

Bei der Durchflußzytometrie handelt es sich um den Nachweis von Proteinen durch Antikörper. Es wurden spezifische primäre Antikörper gegen virale Proteine und Epitope der Wirtszelle eingesetzt. Im Falle der Baumwollratte wurden Antikörper eingesetzt, welche Kreuzaktivität mit Antigenen der Baumwollratte zeigen. Der mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelte zweite Antikörper erkennt den an das Zielprotein gebundenen primären Antikörper. Diese Bindung wird nun über die Fluoreszenzintensität gemessen. Als Fluoreszenzfarbstoff wurde Fluoreszenzisothiocyanat (FITC) verwendet. Wichtige weitere Meßparameter sind die Zellzahl und die Zellgröße. Die Zellen wurden mit PBS/0.1% FKS gewaschen. Die Zelldichte wurde mit Waschpuffer auf 1×10^6 Zellen pro ml eingestellt. Jeweils 5×10^5 Zellen wurden in ein Durchflußzytometrierröhrchen überführt und bei 1500 rpm und 4°C 5 Minuten abzentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und die Röhrchen auf Eis gestellt. Es folgte die Färbung mit dem ersten Antikörper, der in einer Konzentration von $12 \mu\text{g/ml}$ in Antikörper-Verdünnungspuffer aufgenommen wurde und in einem Volumen von $100 \mu\text{l}$ pro Röhrchen hinzugegeben wurde. Als Negativkontrolle für die FACS-Analyse diente ein Röhrchen mit Puffer anstelle des Antikörpers. Alle Röhrchen wurden bei 4°C 60 Minuten inkubiert. Danach wurden die Zellen mit 1 ml Waschpuffer gewaschen, um nicht-gebundenen Antikörper zu entfernen (1500 rpm, 4°C , 5 min). Der Überstand wurde verworfen, die Zellen auf Eis gestellt und $100 \mu\text{l}$ (30 min vorinkubiert) sekundäre Antikörper-Lösung ($12 \mu\text{g/ml}$) hinzugefügt und 60 min bei 4°C inkubiert. Anschließend wurden die Zellen wieder mit Waschpuffer gewaschen (1500 rpm, 4°C , 5 min), der Überstand verworfen und die Zellen für die Analyse in 500 ml FACS-Puffer aufgenommen. Im Falle der intrazellulären Färbung wurden die Zellen zusätzlich vor Zugabe des primären Antikörpers mit 3,7% FA 10 min bei RT fixiert und mit 0,5 ml Triton-X 5 min bei RT permeabilisiert. Die Messung erfolgte am Durchflußzytometer von Becton Dickinson und wurde mit dem Programm Cellquest ausgewertet.

3.2.3. Antikörper-Produktion

Gewinnung von Hybridoma-Überstand

Der erste Schritt zur Aufreinigung von Antikörpern ist die Gewinnung des Hybridoma-Überstandes der jeweiligen Hybridoma-Zelllinie in größerer Menge. Hierfür wurden in einer 2 l-Rollerflasche jeweils 1×10^8 Hybridoma-Zellen in 500 ml Medium ausgesät und bei 37° inkubiert. Nach 2 – 3 Tagen wurden nochmals Hybridoma-Zellen nachgegeben und das Medium um weitere 500 ml aufgefüllt. Innerhalb von ca. 7 – 10 Tagen färbt sich das Medium gelb und lichtmikroskopisch ist der beginnende Zelluntergang zu beobachten. Die Zellsuspension wurde nun in der Großzentrifuge bei 5000 rpm, 4°C , 15 Minuten zentrifugiert. Der Überstand wurde anschließend mit Hilfe eines Faltenfilters zwei mal filtriert um alle Hybridoma-Zellen abzutrennen. Der filtrierte Überstand wurde anschließend in der Affinitätschromatographie weiter verarbeitet.

3.2.4. Antikörper-Reinigung

Affinitätschromatographie mit Protein G

Die Affinitätschromatographie beruht auf der spezifischen Bindung eines immobilisierten Liganden mit dem zu reinigenden Protein. Der Ligand ist dabei kovalent an ein Trägermaterial (z.B. Agarose) gebunden. Es wurde eine gebrauchsfertige, ligandengekoppelte Agarose verwendet (Protein G Sepharose). Der Ligand war in diesem Fall Protein G, ein Oberflächenprotein von Streptokokken, welches hochaffine Bindungsstellen für den Fc-Teil von Immunglobulinen besitzt. Die Chromatographiesäule wurde mit 5 ml Protein G Sepharose-Suspension gefüllt und mit 25 ml Bindungspuffer äquilibriert. Der Hybridoma-Überstand wurde unverdünnt bei 4°C mit einer Peristaltik-Pumpe auf die Säule aufgetragen. Die folgenden Schritte erfolgten am Eluierungsgerät. Um nicht gebundene Proteine zu entfernen, wurde die Säule zuerst 20 Minuten mit Bindungspuffer durchspült. Anschließend erfolgte die

Dissoziation der gebundenen Antikörper von dem Liganden mit Hilfe des sauren Elutionspuffers. Die Elution der Antikörper wurde UV-spektrometrisch kontrolliert und konnte als Verlaufskurve verfolgt werden. Um die Stabilität des Antikörpers zu gewährleisten, wurde das Eluat sofort mit 1 M Tris-Puffer auf einen pH-Wert von 7.5 eingestellt. Anschließend wurde der Antikörper im Dialyseschlauch in einem Volumen von 5 l PBS 48 Stunden lang bei 4°C dialysiert. Das PBS wurde währenddessen zwei mal gewechselt.

Die Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Bestimmung der Proteinkonzentration wurde mit dem Protein Assay I (BioRad) durchgeführt. Als Standardprotein wurde Bovines Serum Albumin verwendet. Bei jedem Test wurde eine Eichkurve mit Standardkonzentrationen von 1 – 15 mg erstellt sowie ein Leerwert mitgeführt. 10 bzw. 40 µl der Probe wurden der Protein-Assay-Lösung zugegeben. Die optische Dichte des entstandenen Farbstoffs wurde am Photometer bei 595 nm gegen den Leerwert gemessen. Nach der Proteinbestimmung wurde der Antikörper aliquotiert (1 ml) und bei –20°C eingefroren.

3.2.5. Zytokin-Nachweis mittels RT-PCR

Zum Nachweis von Zytokinen aus der Baumwollratte stehen keine kommerziellen immunologischen Assays zur Verfügung. Daher wurden die Zytokine molekularbiologisch mittels RT-PCR nachgewiesen. Dafür wurde Gesamt-mRNS aus Zellen isoliert, mit Reverser Transkriptase (Superscript II) in cDNS umgeschrieben, diese mit spezifischen PCR-Primern amplifiziert und mittels Agarose-Gelelektrophorese nachgewiesen.

RNS-Isolation

Es wurden 5×10^6 Zellen pelletiert, in 350 µl Lysis-Puffer (β -Mercaptoethanol 10 µl/ml) resuspendiert und 15 min bei 14 000 rpm zentrifugiert. Dem Überstand wurden 350 µl

70%iger Ethanol hinzugegeben, gemischt, auf eine Säule gegeben (Quiagen) und 15 Sekunden bei 10 000 rpm zentrifugiert. Die Säulen wurde mit 700 µl Waschpuffer RW1 gewaschen (15 Sekunden, 10 000 rpm), danach ein zweites Mal 500 µl auf die Säulen gegeben und wiederum zentrifugiert. Die gebundene RNS wurde mit 38 µl RNase-freie Aqua dest. eluiert (60 Sekunden, 10 000 rpm).

Reverse Transkription

Für die reverse Transkription wurden 36 µl Eluat eingesetzt. Danach wurden 3 µl Oligo-dT-Primer (25 µM) hinzugegeben und 10 min bei 70°C inkubiert. Die Reaktionsgefäße wurden auf Eis gestellt und je 21 µl RT-Mischung hinzugefügt (12 µl 5x Puffer, 6 µl 0.1 M DTT, 3 µl 40 mM dNTPs). Die Ansätze wurden 2 min bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde 3 µl Superscript II (200 E/µl) dazugegeben und die RT-Reaktion 1 h bei 37°C durchgeführt.

Zytokin-PCR

Aus publizierten Gensequenzen wurden PCR-Primer (Tab. 2.4) entworfen. Alle Ansätze wurden auf Eis pipettiert. Es wurde folgender PCR-Mix hergestellt:

PCR-Mix

5 µl 10x PCR-Puffer
0.5 µl dNTPs (20 mM)
1 µl Forwärts Primer (80 µM)
1 µl Rückwärts Primer (80 µM)
0.3 µl Taq-Polymerase (5 U/µl)
5 µl cDNA
auf 50 µl steriles Aqua dest.

PCR-Zyklen

1 min 94°C Denaturierung
30 sek. 55°C Annealing
1 min 72°C Elongation 30 Zyklen
10 min 72°C Extension 1 Zyklus
bei 4°C gehalten

Gel-Elektrophorese

Es wurden je 10 µl der PCR-Proben mittels 1% Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und durch Ethidiumbromid visualisiert.

3.3. Virologische Methoden

3.3.1. Zucht von Masernvirus-Impfstämmen

Vero Zellen, die in einer 250 ml Zellkulturflasche zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen waren, wurden mit MV-Impfstämmen mit einer MOI von 0,01-0,005 infiziert. Nach einer Stunde bei 37°C wurde das Inokulum entfernt. Die Zellen wurden in MEM/2 % FCS bei 33°C bis zum Auftreten eines zytopathischen Effekts kultiviert. Nach etwa drei Tagen zeigte der Zellrasen einen 90-95%igen CPE und das Medium wurde komplett entfernt. Nun wurden 5 ml PBS zugeben und die Flaschen mit den Zellen für zwei Stunden bei -20°C eingefroren. Durch rasches Auftauen und heftiges Schwenken der Eisstücke über den Zellrasen wurden die Zellen aufgebrochen. Zusätzlich wurde nach Auftauen der Lösung mehrmals mit einer 10 ml Pipette suspendiert. Die Zelltrümmer wurden durch 10-minütige Zentrifugation bei 1000 rpm, 4°C abgetrennt. Der virushaltige Überstand wurde in vorgekühlte Schraubdeckelröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Da das MV sehr temperaturempfindlich ist, war es wichtig, die Viruspräparation schnell und bei niedrigen Temperaturen durchzuführen.

3.3.2. Zucht von Masernvirus-Wildtypstämmen

Eine dichtgewachsene BJAB-Kultur (1×10^8 /250 ml Kulturflasche) wurde für 10 min bei 1000 rpm und 15°C zentrifugiert und das Pellet in 5 ml RPMI vorsichtig resuspendiert. Die Zellen wurden mit 0.002 MOI Virus 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde 25 ml RPMI-Medium/2% FKS zugegeben. Diese Zellen wurden ca. 2-3 Tage im Brutschrank bis zur Ausbildung von 80-90% CPE kultiviert. Für die Hauptinfektion wurden 5 500 ml Kulturflaschen BJAB-Zellen zentrifugiert und das Pellet in 5 ml RPMI vorsichtig resuspendiert. Danach wurden 6 ml der Präinfektion zu jeder Flasche hinzugefügt. Anschließend wurde 40 ml RPMI-Medium /2% FKS zugegeben. Die Zellen wurde ca. 2-3 Tage im Brutschrank bis zur Ausbildung von 80-90% CPE kultiviert. Zur Isolierung des Virus wurden die Zellen 10 min, 1000 rpm, 15°C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 3 ml PBS/Kulturflasche resuspendiert und über Nacht bei 80°C eingefroren. Nach dem Auftauen wurde gut resuspendiert, 2 x zentrifugiert (20 min, 4°C, 3000 rpm) und Aliquots in flüssigem Stickstoff aufbewahrt.

3.3.3. Plaquetest

Je 5×10^5 Vero Zellen wurden am Vortag in den Näpfen einer 6-Cluster-Platte ausgesät. Die Zellen waren am nächsten Tag zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen. Der Virusstock wurde in Medium in Zehnerschritten $1:1 \times 10^2$ bis zu $1:1 \times 10^7$ verdünnt. Die Zellen wurden dann mit je 1 ml der Verdünnung infiziert. Nach 1h Inkubation wurde das Inokulum abgezogen und die Zellen mit 3 ml Top-Agar, der eine Temperatur von 42°C hatte, überschichtet. Dieser setzte sich aus 7,5 ml 2%igem Agar, 7,5 ml doppelt konzentriertem MEM und 5 ml MEM/5 % FCS zusammen. Nach Abkühlen und Verfestigung des Agars wurden die Platten für etwa 3 Tage im Brutschrank bis zum Auftreten eines deutlichen CPE inkubiert. In jeden Napf wurde nun zur Sichtbarmachung der Plaques 1 ml einer 1:200 in PBS verdünnten Neutralrotlösung gegeben. Nach einer Stunde wurde der Überstand abgezogen und nochmals im Brutschrank inkubiert bis die Plaques ausgezählt werden konnten. Es wurden jeweils

Doppelbestimmungen durchgeführt. Die Anzahl der in der niedrigsten Verdünnungsstufe erhaltenen Plaques wurde für die Berechnung des Virustiters verwendet.

3.3.4. TCID₅₀

In eine 96 Loch-Platte wurden pro Loch 50 µl 1×10^5 B95a in RPMI /4+ ohne FKS ausgesät. Es wurde eine Virusverdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-11} in RPMI /4+ ohne FKS hergestellt. Zu jedem Loch wurde 100 µl der Verdünnung dazugegeben und 1 h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Anschließend wurden 50 µl RPMI Medium 8% FKS pro Loch zugegeben und am 7. Tag ausgewertet. Der Titer wurde nach der Methode von Read und Münch ermittelt.

3.3.5. Reinigung von MV durch Passagierung in der Baumwollratte

Zur Entfernung auftretender Kontaminationen mit EBV und Mycoplasmen während der Passagierung von MV-Wildtypstämmen, wurde eine Methode zur Reinigung etabliert. Diese beruht darauf, dass das humanpathogene Virus EBV nicht aus der Baumwollratte rückisoliert werden kann, dabei wurden die Mycoplasmen von den Makrophagen phagozytiert.

Dafür wurde am Tag 4 nach intranasaler Infektion eine Lungen-Lavage (Abs.3.4.2.1) durchgeführt. Die Zellen der bronchoalveolären Lavage wurden mit PBS (0.1% FKS) gewaschen und zentrifugiert (10 min, 1000 rpm, 15°C). Danach wurden die Zellen in 20 ml MEM (5% FKS) aufgenommen und in einer 500 ml Kulturflasche für 3 h adhärirt. Nach Entfernen des Mediums wurde 10 ml 10^8 BJAB-Zellen in RPMI (4+ ohne FKS) hinzugegeben und für 1h bei 37°C im Brutschrank inkubiert. Nach Beendigung der Inkubation wurde 30 ml RPMI (4+, 3% FKS) zugefügt und 3-4 Tage kokultiviert bis sich ein CPE von ca. 90% ausgebildet hatte. Anschließend erfolgte die Isolation des Virus wie in Abs. 3.3.2. beschrieben.

3.4. Tierexperimentelle Methoden

3.4.1. Intranasale Infektion

Die Baumwollratten wurden intranasal mit unterschiedlichen Dosen an Masern-Viren infiziert. Das maximale Infektionsvolumen für Baumwollratten betrug 100 µl und das minimale 50 µl. Als Trägermedium wurde steriles PBS verwendet. Für die Infektion wurden die Baumwollratten in tiefe Narkose versetzt und das Inokulum mit Hilfe einer 200 µl Pipette und sterilen gelben Spitzen in die Nasenöffnung des Versuchstieres überführt. Durch die Atmung des Versuchstieres gelangte die Infektionslösung schließlich in die Lunge.

3.4.2. Organentnahme und Präparation von primären Zellen

Baumwollratten wurden durch Inhalation von CO₂ getötet. Die Peritonealhöhle wurde steril eröffnet und nach Instrumentenwechsel die verschiedenen Organe entnommen.

3.4.2.1. Lungen-Lavage

Die Baumwollratten wurden mit Trockneis getötet und die Halsregion und der Brustkorb mit Ethanol desinfiziert. Der Bauchraum und Brustkorb wurden sehr weit geöffnet, so daß sich die Lungenflügel ausreichend ausdehnen können. Das Herz wurde punktiert und von Hals- und Brustregion die Haut abgelöst. Die Baumwollratten wurden auf eine Styroporplatte fixiert. Durch Abheben der Halsfaszie mit einer feinen Pinzette und Einritzen in Längsrichtung mit einer Schere wurde die Trachea freigelegt. Mit einer gebogenen Pinzette wurde ein Faden unter der Trachea hindurchgeführt und damit die Luftröhre direkt unterhalb des Kehlkopfes abgebunden. Ein zweiter Faden wurde unter der Trachea hindurchgeschlungen. Die Trachea wurde zwischen zwei Knorpelspangen mit der Spitze einer Braunüle eingeritzt. Nach Zurückziehen der Nadel aus der Braunüle wurde ein Plastikröhrchen in die Trachea eingeführt und mit einem zweitem Faden

fixiert. Anschließend wurde der Dreiwegehahn und Spritzen an die Brauntüle angeschlossen. Die Lungen-Lavage-Flüssigkeit (2-3 ml pro Portion) wurde vorsichtig eingebracht und genauso sorgsam aspiriert. Diese Flüssigkeit wurde in ein vorsilikonisiertes 50 ml Röhrchen auf Eis gestellt.

3.4.2.2. Milzen

Die Milzentnahme erfolgte mit sterilen Pinzetten, womit die Milzen auch von anhaftendem Gewebe befreit wurde. Zur Vorbereitung der Zellpräparation wurde die Milz unter der Sterilbank präpariert. Die Milz wurde mit Hilfe eines sterilen Spritzenkolbens durch ein Stahlsieb gestrichen. Die Zellsuspensionen wurden jeweils in einem 50 ml Röhrchen in 40 ml Waschpuffer aufgenommen und für 10 min bei 1000 rpm und 15°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang zweimal wiederholt. Während des letzten Waschganges wurden die Zellen gezählt und je nach Verwendungszweck eingesetzt.

3.4.2.3. Virusrückisolierung aus der Lunge

Virusrückisolierung von MV Impfstämmen

Die Lungen wurden entnommen, auf Eis gelagert und einzeln gewogen. Anschließend wurden sie unter der Sicherheitswerkbank mit einer Schere grob zerkleinert und auf Eis unter Zugabe von 2 ml vorgekühltem MEM-Medium in einem 15 ml-Glashomogenisator zerstoßen. Von dem Homogenisat wurden danach 4 Verdünnungsreihen in Zehnerschritten angelegt. Die verschiedenen Verdünnungsstufen, sowie unverdünntes Homogenisat, wurden in einem Volumen von 170 µl auf jeweils 6 Vertiefungen einer Zellkulturplatte (mit insgesamt 48 Vertiefungen) zu Vero-Zellen pipettiert und für 60 Minuten bei 37 °C inkubiert. Die Vero-Zellen wurden mindestens 2 Stunden zuvor ausgesät, jeweils 6 Vertiefungen pro Verdünnungsstufe und ca. 10⁵ Zellen pro Vertiefung. Nach 60 Minuten Inkubation im Brutschrank wurde die Platte dreimal mit PBS gewaschen und schließlich 500 µl Vero-Zellmedium pro Vertiefung

hinzugegeben. Die Platte wurde für eine Woche in den Brutschrank gestellt. Danach erfolgte die lichtmikroskopische Beurteilung hinsichtlich eines zytopathischen Effekts. Als positiv wurde dabei gewertet, wenn mehr als 50 % des Zellrasens zerstört war. Für die Berechnung der Virusmenge, die benötigt wird um mehr als 50 % der Zellkultur-Platte zu infizieren (TCID₅₀), wurde das Verfahren nach Reed und Muench verwendet (REED u. MUENCH 1938).

Virusrückisolierung von MV Wildtypen

Die Lungen wurden entnommen und homogenisiert wie bei MV Impfstämmen. Anstelle von Vero-Zellen wurden B95a-Zellen verwendet und mindestens 3 h zuvor ausgesät. Das weitere Verfahren wurde wie bei MV Impfstämmen durchgeführt.

3.4.2.4. Mediastinale drainierende Lymphknoten

Die mediastinalen drainierenden Lymphknoten liegen unter dem linken und rechten Lungenflügel. Zur Vorbereitung der Zellpräparation wurden die Lymphknoten unter der Sterilbank mittels eines sterilen Skalpells mehrfach angeschnitten. Um die Zellen zu vereinzeln wurden die Lymphknoten mit Hilfe eines sterilen Spritzenkolbens durch ein Stahlsieb gestrichen. Die Zellsuspensionen wurden jeweils in einem 50 ml Röhrchen in 40 ml Waschpuffer aufgenommen und für 10 Minuten bei 1000 rpm und 15°C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und der Waschvorgang mit dem Sediment zweimal wiederholt. Während des letzten Waschgangs wurden die Zellen gezählt und schließlich je nach Verwendungszweck eingesetzt.

4. Ergebnisse

4.1. Immunsuppressiver Effekt von MV-Wildtypen und Impfstämmen

In Zellkulturexperimenten induzieren MV-Wildtyp- und Impfstämme einen gleich starken immunsuppressiven Effekt. Im Menschen rufen MV-Wildtypviren akute Masern und eine ausgeprägte Immunsuppression hervor, die häufig zu mikrobiellen Sekundärinfektionen und damit verbunden, besonders in den Entwicklungsländern, zu Todesfällen führt. Im Gegensatz dazu treten nach der MV Impfung keine opportunistischen Infektionen auf. In der vorliegenden Arbeit wurde das unterschiedliche immunsuppressive Potential von MV-Wildtypviren im Vergleich zu Impfstämmen im Baumwollratten-System untersucht..

4.1.1. Vergleich der Proliferationsinhibition nach MV-Infektion mit Wildtyp (WTF) und Impfstamm (Edm) in Zellkultur.

Zuerst wurde untersucht, ob es im Baumwollratten-System *in vitro* Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsinhibition zwischen Wildtyp und Impfstamm gibt. Dazu wurde die Baumwollratten-Zelllinie CR-T2 mit Wildtypstamm WTF und Impfstamm Edm infiziert. Da gezeigt worden ist, daß die Inhibition der Proliferation durch die Oberflächenproteine H und F induziert wird, wurde die Expression dieser Proteine in infizierten CR-T2 Zellen mit Hilfe der Durchflußzytometrie überprüft. Die Infektion mit beiden MV-Stämmen führte zu einer vergleichbaren Expression der Glykoproteine. Um die Zellteilung der CR-T2 Zellen zu verhindern, wurden diese mit UV bestrahlt. Die so behandelten Zellen wurden mit Milzzellen aus naiven Baumwollratten kokultiviert und mit Mitogen stimuliert. Nach Kontakt mit nicht infizierten CR-T2-Zellen zeigten die T-Zellen eine starke Proliferation (Abb. 4.1.). Im Gegensatz dazu war die Proliferation von Milzzellen nach Kontakt mit MV-infizierten Zellen gehemmt. Dabei bestand kein Unterschied zwischen Wildtyp und Impfstamm was mit den Ergebnissen in humanen Zellen korreliert.

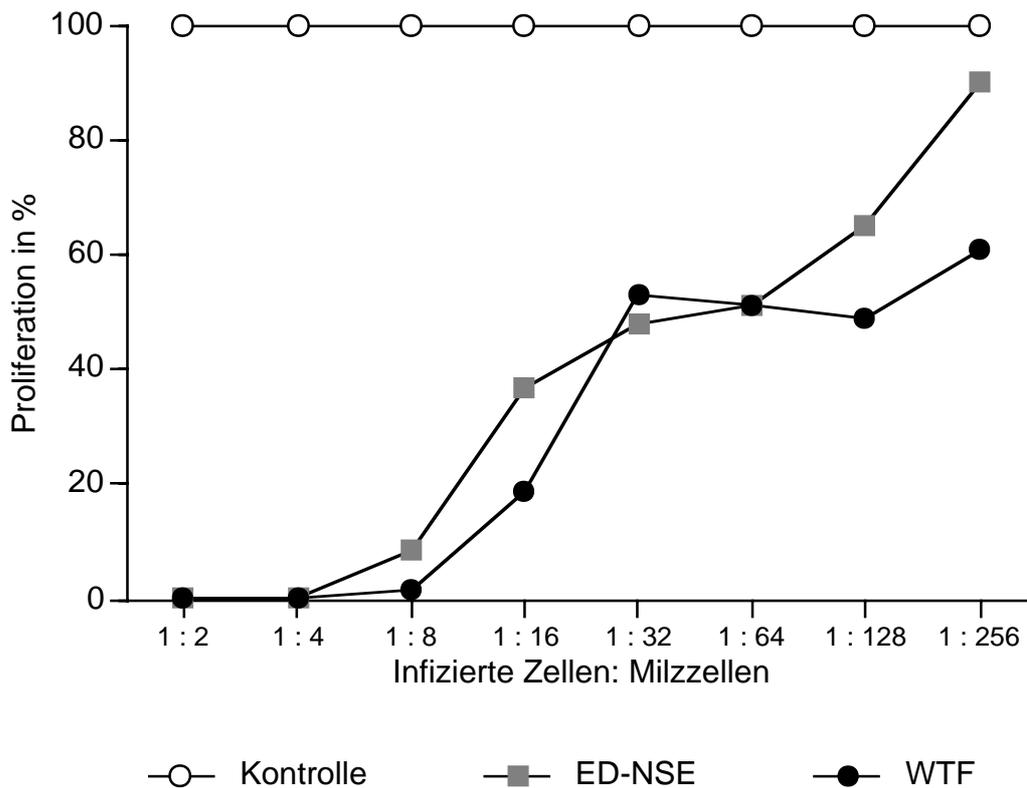


Abb. 4.1.: Verlauf der Proliferationsinhibition von Baumwollratten-Milzzellen nach Kontakt mit WTF und Edm infizierten CR-T2.

Milzzellen von nicht infizierten Baumwollratten (5×10^5 /Loch) wurden in verschiedenen Verhältnissen mit infizierten CR-T2 Zellen kokultiviert und mit Concavalin A ($2,5 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Nach 72h Inkubation wurde der Einbau von ^3H -Thymidin gemessen. Die Daten repräsentieren eines von vier durchgeführten Experimenten.

4.1.2. Vergleich der Induktion einer Proliferationshemmung durch Infektion mit WTF und Edm im Baumwollratten-Modell

Die immunsuppressiven Eigenschaften beider Virusstämme *in vitro* wurden nun mit der Infektion *in vivo* anhand des Einflusses auf die T-Zell-Proliferation verglichen.

Baumwollratten wurden intranasal mit WTF (10^5 TCID₅₀) oder Edm (10^5 TCID₅₀) infiziert. An verschiedenen Tagen nach Infektion wurden die Tiere getötet und die Milzen

entnommen. Nach Stimulation mit dem Mitogen Concavalin A wurde die Proliferation der T-Zellen *ex vivo* durch Einbau von ^3H -Thymidin gemessen. Nach Infektion mit Edm proliferierten Milzzellen genauso gut wie Milzen von nichtinfizierten Tieren. Im Gegensatz dazu führt die Infektion mit WTF zu einer ausgeprägten und andauernden Proliferationsinhibition. Diese begann an Tag 2, war an Tag 3 am ausgeprägtesten und war ab Tag 20 nicht mehr feststellbar (Abb. 4.2.). Der Versuch durch erhöhten Virustiter ($2\text{-}4 \times 10^6$ TCID₅₀ Edm B) einen immunsuppressiven Effekt zu erzielen, führte erst ab Tag 3 zu einer Proliferationsinhibition, welche bereits am Tag 10 nicht mehr meßbar war (Abb. 4.3. aus: NIEWIESK et al. 1997).

Damit können die beim Menschen gefundenen Unterschiede zwischen Vakzine und Wildtypstämmen in Hinblick auf die Immunsuppression auch in Baumwollratten beobachtet werden.

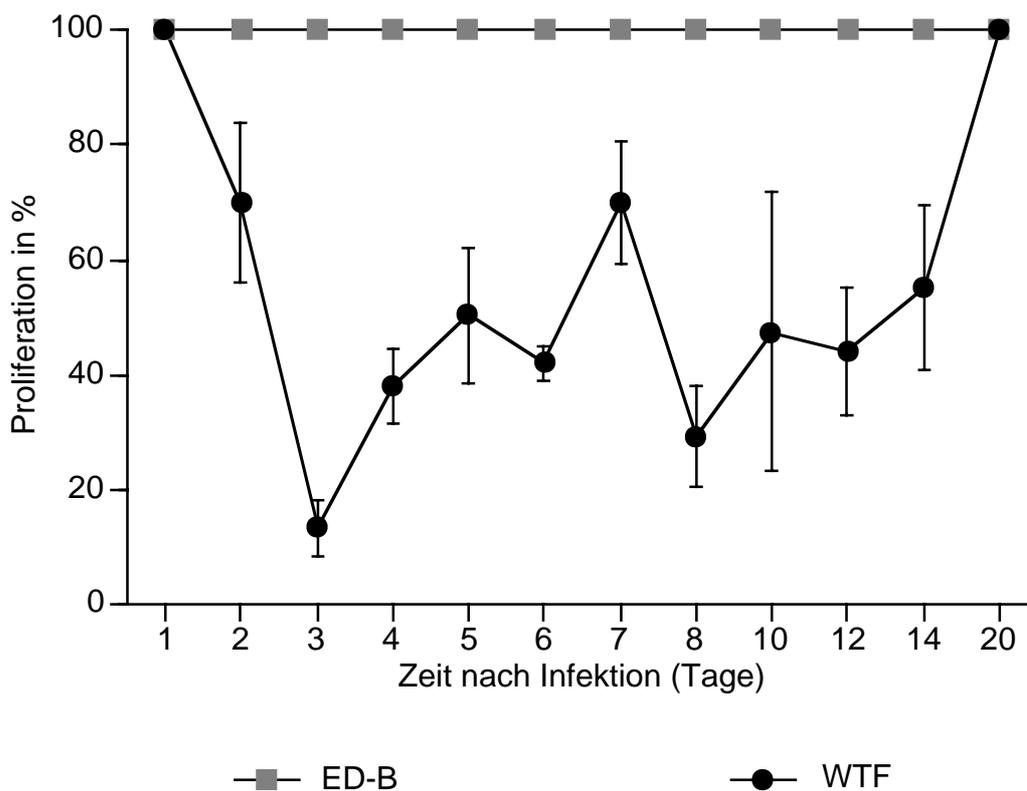


Abb. 4.2.: Unterschiede in der Kinetik der Mitogen-stimulierten Proliferation nach Infektion mit WTF und Edm.

Die Tiere wurden intranasal mit 10^5 TCID₅₀ infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten wurden 3 Gruppen

(Edm, WTF und nichtinfizierte Tiere als Kontrolle) mit je 4 Tiere eingesetzt. Die entnommenen Milzen wurden mit Concavalin A stimuliert und nach 72 Stunden wurde der Einbau von ^3H -Thymidin gemessen. Die Proliferation ist als Prozentsatz der Proliferation naiver Milzzellen (100 %) dargestellt. Die Standardabweichung wurde als Fehlerbalken angegeben.

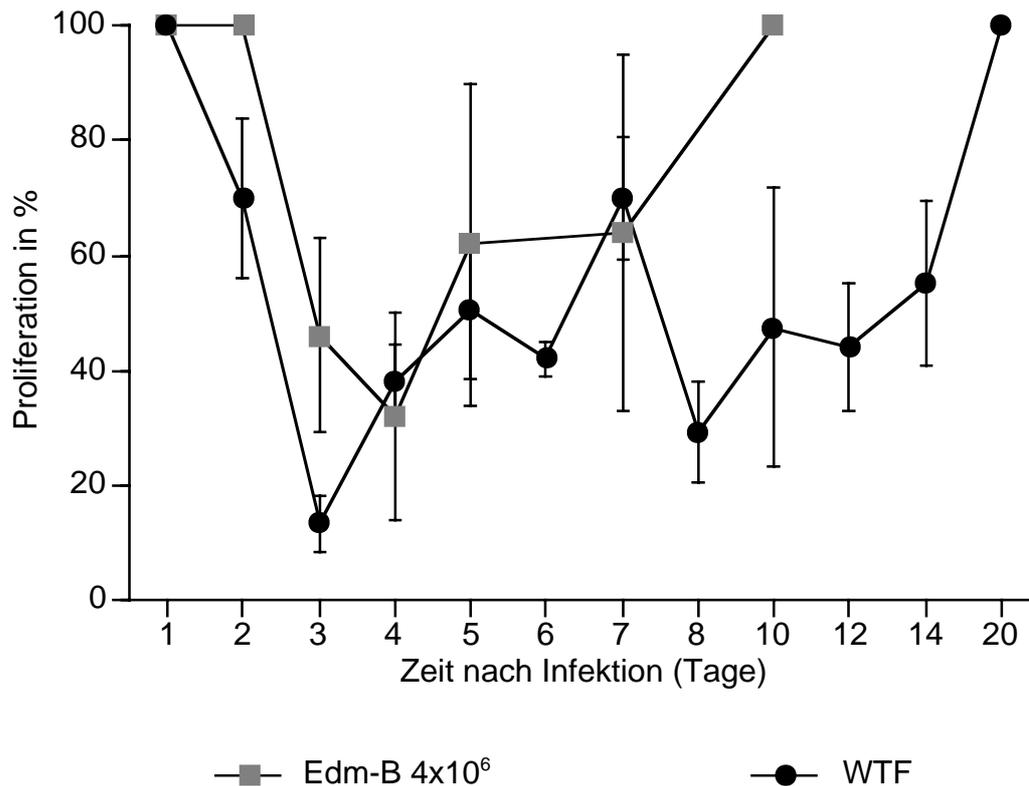


Abb. 4.3.: Unterschiede in Kinetik der Mitogen-stimulierten Proliferation nach Infektion mit 10^5 TCID₅₀ WTF und $2-4 \times 10^6$ TCID₅₀ Edm B.

Die Daten zur Edm-Infektion wurden aus NIEWIESK et al. 1997, die Daten zur WTF Infektion aus Abb. 4.2 entnommen und miteinander verglichen.

4.1.2.2. Ausbreitung und Replikation von WTF und Edm (Viruslast in der Lunge und Virusreplikation in den mediastinalen Lymphknoten) nach Infektion mit WTF und Edm.

Parallel zur Proliferation wurde die Virusausbreitung im Organismus an verschiedenen Tagen nach der Infektion untersucht. Dafür wurde die Viruslast in der Lunge 4 Tage nach der Infektion bestimmt, indem die Lunge nach Lavage homogenisiert und der Virustiter mit Indikatorzellen im TCID₅₀-Test ermittelt wurde. Außerdem wurden die drainierenden mediastinalen Lymphknoten entnommen, die Lymphknoten vereinzelt und mit Indikatorzellen im TCID₅₀-Test der Virustiter bestimmt (Abb. 4.4.). Bei gleicher intranasaler Dosis vermehrt sich WTF im Vergleich zu Edm in der Lunge besser und ergibt einen 10fach höheren Virustiter (Abb. 4.4. A). Nach Infektion mit Edm ließ sich kein Virus in den drainierenden Lymphknoten nachweisen (Abb. 4.4. B). Während der Infektion mit WTF kam es zu einer Ausbreitung des Virus in den drainierenden Lymphknoten. Der Virus ließ sich von Tag 2 bis Tag 4 nach der Infektion nachweisen. Das bedeutet, daß die Proliferationshemmung mit der Virusausbreitung in die drainierenden Lymphknoten korreliert.

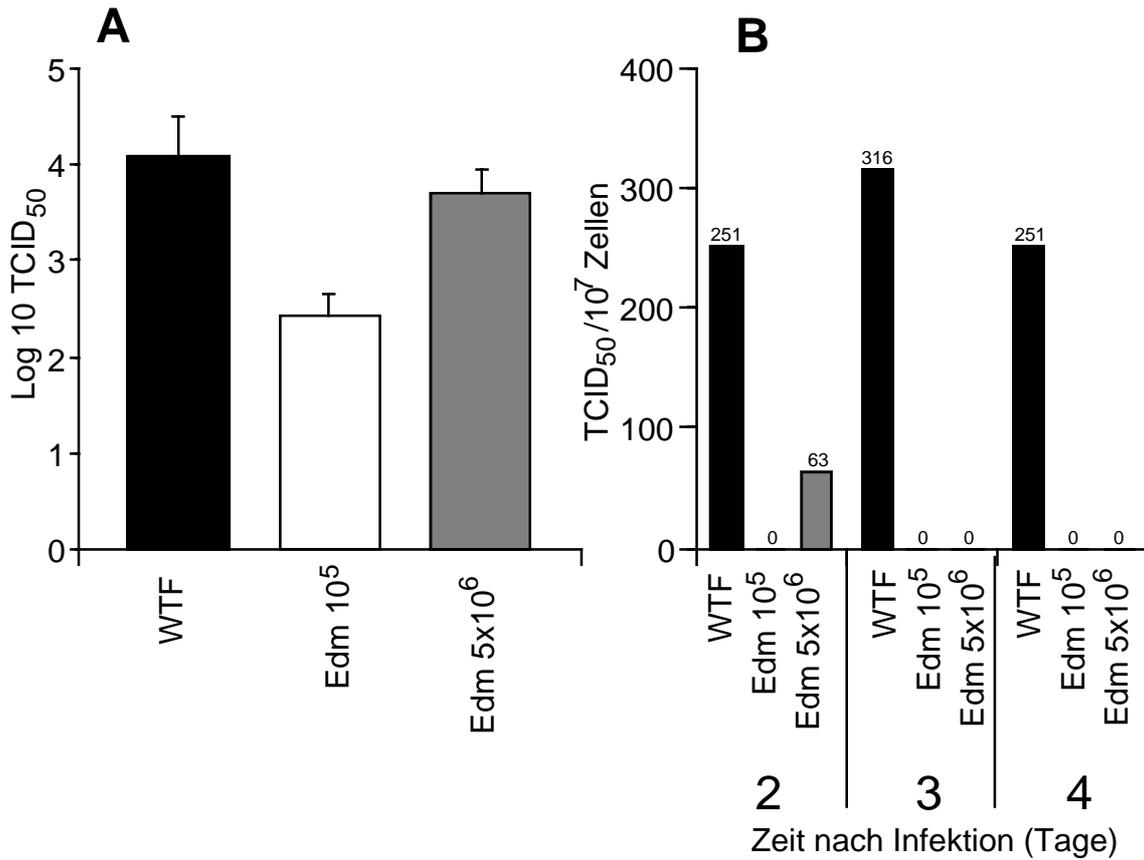


Abb. 4.4.: Bestimmung der Viruslast in Lunge und in den drainierenden Lymphknoten nach Tag 4 p.i.

Es wurden Gruppen von je 4 Tieren intranasal mit 10^5 TCID₅₀ WTF, Edm B bzw. 5×10^6 TCID₅₀ Edm B infiziert. Die Lungen und die drainierenden Lymphknoten wurden entnommen. (A) Der Virustiter wurde als \log_{10} TCID₅₀ Lungengewebe dargestellt. Die Standardabweichung wurde als Fehlerbalken angegeben. (B) Die Lymphknotenzellen von 4 Tieren wurden vereinigt und der TCID₅₀/10⁷ Zellen bestimmt.

4.1.3. Korrelation der Infektionsdosis von WTF mit Proliferationsinhibition und Virusreplikation in drainierenden Lymphknoten

Um zu untersuchen, welche Menge an WTF notwendig ist, um einen proliferationshemmenden Effekt zu erzeugen, wurden Baumwollratten mit unterschiedlichen Dosen von WTF intranasal infiziert. Eine niedrigere Virusdosis führte zu einem schwächeren proliferationshemmenden Effekt (Abb. 4.5. A). Dabei zeigte sich, daß eine intranasale Dosis von 10^3 TCID₅₀ ausreichend war eine T-Zell-Proliferationshemmung zu erzielen. Dies korreliert mit der Ausbreitung des Virus in den drainierenden Lymphknoten (Abb.4.5.B).Das bedeutet, dass in Baumwollratten im Vergleich zu Edm eine 1000fach geringere Dosis an WTF ausreichend war, um eine Proliferationshemmung zu induzieren.

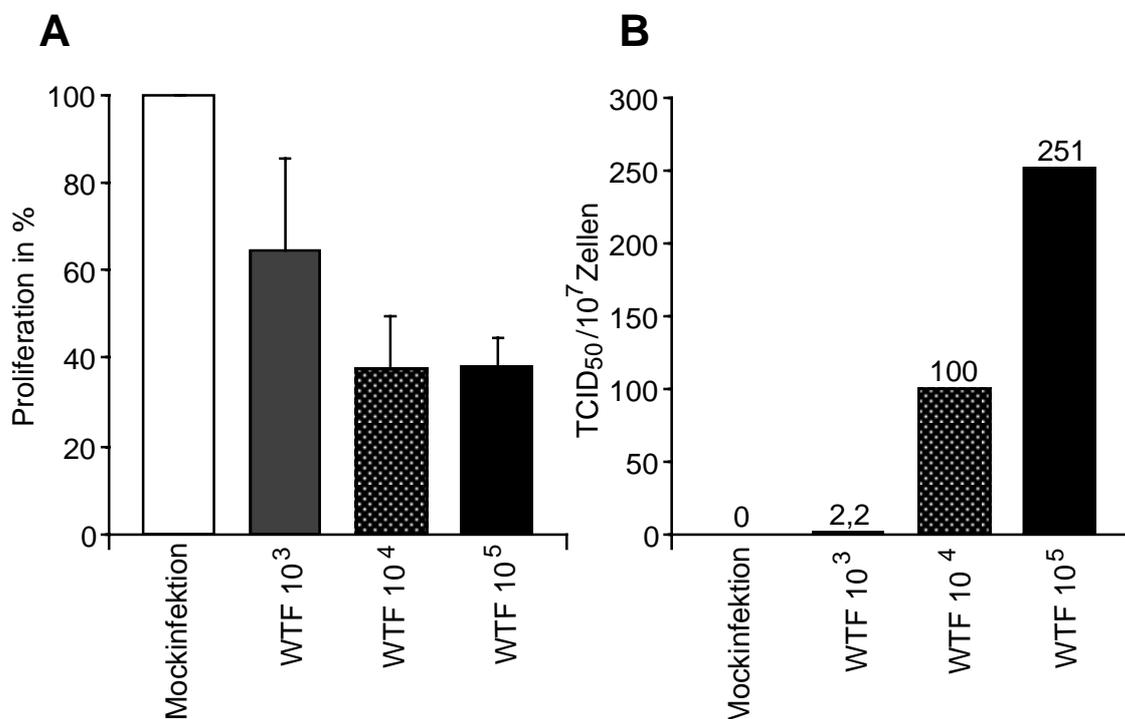


Abb. 4.5.: Dosis-abhängige Korrelation nach WTF-Infektion zwischen Proliferationsinhibition und Virusreplikation in den drainierenden Lymphknoten.

Die Baumwollratten wurden mit verschiedenen Dosen an WTF infiziert. Am Tag 4 p.i. wurden die

Milzen und Lymphknoten entnommen. (A) Die Proliferation ist als Prozentsatz der Proliferation naiver Milzzellen (100%) dargestellt. Die Standardabweichung wurde als Fehlerbalken angegeben. (B) Die Lymphknotenzellen von 4 Tieren wurden vereinigt und der $TCID_{50}/10^7$ Zellen bestimmt.

4.1.4. Untersuchungen über Viruspräsenz in drainierenden Lymphknoten sowie Proliferationsinhibition von weiteren MV-Wildtypvirusstämmen

Um zu überprüfen, ob die gefundenen Unterschiede zwischen WTF und Edm bezüglich Proliferationsinhibition und Ausbreitung repräsentativ waren, wurden zwei weitere Wildtypstämme, nämlich Bilthoven und ICB untersucht. Die Wildtypviren Bilthoven und ICB wurde ausgewählt, weil diese akute Masern in Affen verursachten (KOBUNE et al. 1996, AUWAERTER et al. 1999).

Die Wildtypviren zeigten eine deutliche Proliferationsinhibition (Abb. 4.6. A) und Virusreplikation in den drainierenden Lymphknoten (Abb. 4.6. B). Im Gegensatz dazu zeigt der Impfstamm Edm-B keine Proliferationsinhibition (Abb. 4.6. A) im Vergleich zu nichtinfizierten Kontrolltieren. Außerdem zeigte der Impfstamm keine Ausbreitung in die drainierenden Lymphknoten (Abb. 4.6. B). Offensichtlich wirken Wildtypstämme stärker immunsuppressiv und breiten sich besser im Organismus der Baumwollratte aus als Impfstämme.

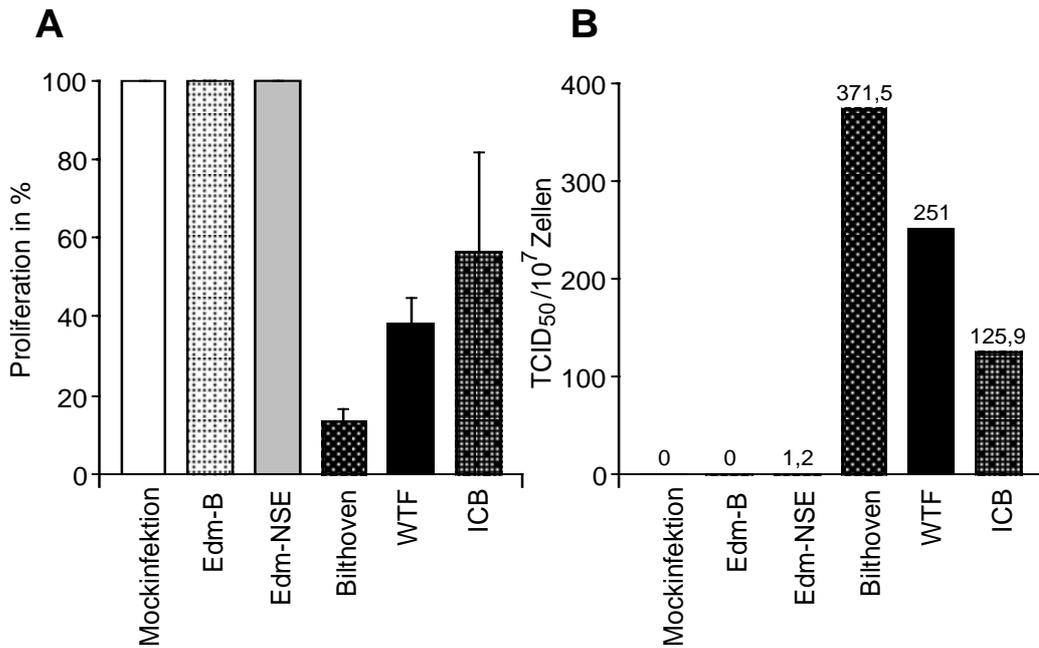


Abb. 4.6.: Vergleich der Proliferationsinhibition und Virusreplikation in den drainierenden Lymphknoten zwischen MV Wildtypen und Impfstämmen.

Es wurden 6 Gruppen mit je 4 Tieren gebildet und jede Gruppe mit einem MV-Wildtyp oder Impfstamm infiziert. Am Tag 4 p.i. wurden die Milzen und Lymphknoten entnommen. (A) Die Proliferation ist als Prozentsatz der Proliferation naiver Milzzellen (100%) dargestellt. Die Standardabweichung wurde als Fehlerbalken angegeben. (B) Die Lymphknotenzellen von 4 Tieren wurden vereinigt und der TCID₅₀/10⁷ Zellen bestimmt.

4.1.5. Einfluß auf Immunsuppression und Ausbreitung von unterschiedlich passagierten Masernvirusstämmen anhand von Proliferationsinhibition, Viruslast in der Lunge und Virusreplikation in drainierenden Lymphknoten

Es ist bekannt, daß die Passage von Masern-Wildtypviren auf Fibroblasten-Zelllinien zu einer Attenuierung der Viren führt. Die Passage auf lymphoiden Zellen beeinflusst die

Pathogenität dagegen nicht. Um den Einfluss der Passagierung *in vitro* auf das *in vivo* Verhalten der Viren im Baumwollrattenmodell zu untersuchen, wurden in Zellkultur unterschiedlich passagierte Viren getestet. Als erstes wurde WTF-b mit WTF-v verglichen. Der Wildtypvirus WTF-b wurde über viele Passagen auf humanen lymphoiden BJAB-Zellen gezogen, das Derivat WTF-v dagegen auf Affen-Fibroblasten-Vero-Zellen passagiert. WTF-b zeigte eine deutliche proliferationsinhibierende Wirkung. Dagegen führte WTF-v nur zur einer schwachen Unterdrückung der Proliferation (Abb. 4.7. A). Außerdem zeigte WTF-b hohe Titer in der Lunge und deutliche Ausbreitung in drainierenden Lymphknoten im Vergleich zu WTF-v (Abb. 4.7. B, C).

Als zweites Viruspaar wurden Edm-B und Edm-WT verglichen. Edm-B ist ein Patientenisolat, welcher 50mal auf Fibroblasten passagiert wurde und war das erste zugelassene Impfvirus in den USA. Edm-WT ist ursprünglich ein Patientenisolat und diente als Vorläufer für alle Impfstoffe. Die hier verwendete Edm-WT-Charge ist 9 mal auf Fibroblasten-Zellen passagiert. Es wurde kein Unterschied in der Proliferationsinhibition und Ausbreitung zwischen diesen beiden Viren gefunden (Abb. 4.7. A, B, C). Da Edm-WT ausgehend von dem ursprünglichen Isolat passagiert worden war, wurde untersucht, ob eine *in vivo* Passage zu Rückmutation des Virus führen würde. Deswegen wurde Edm-WT zusätzlich zweimal *in vivo* in Baumwollratten und danach dreimal auf BJAB-Zellen passagiert (Edm-WT2+3). Diese zusätzlichen Passagen ergeben ein virulenteres Virus in Baumwollratten.

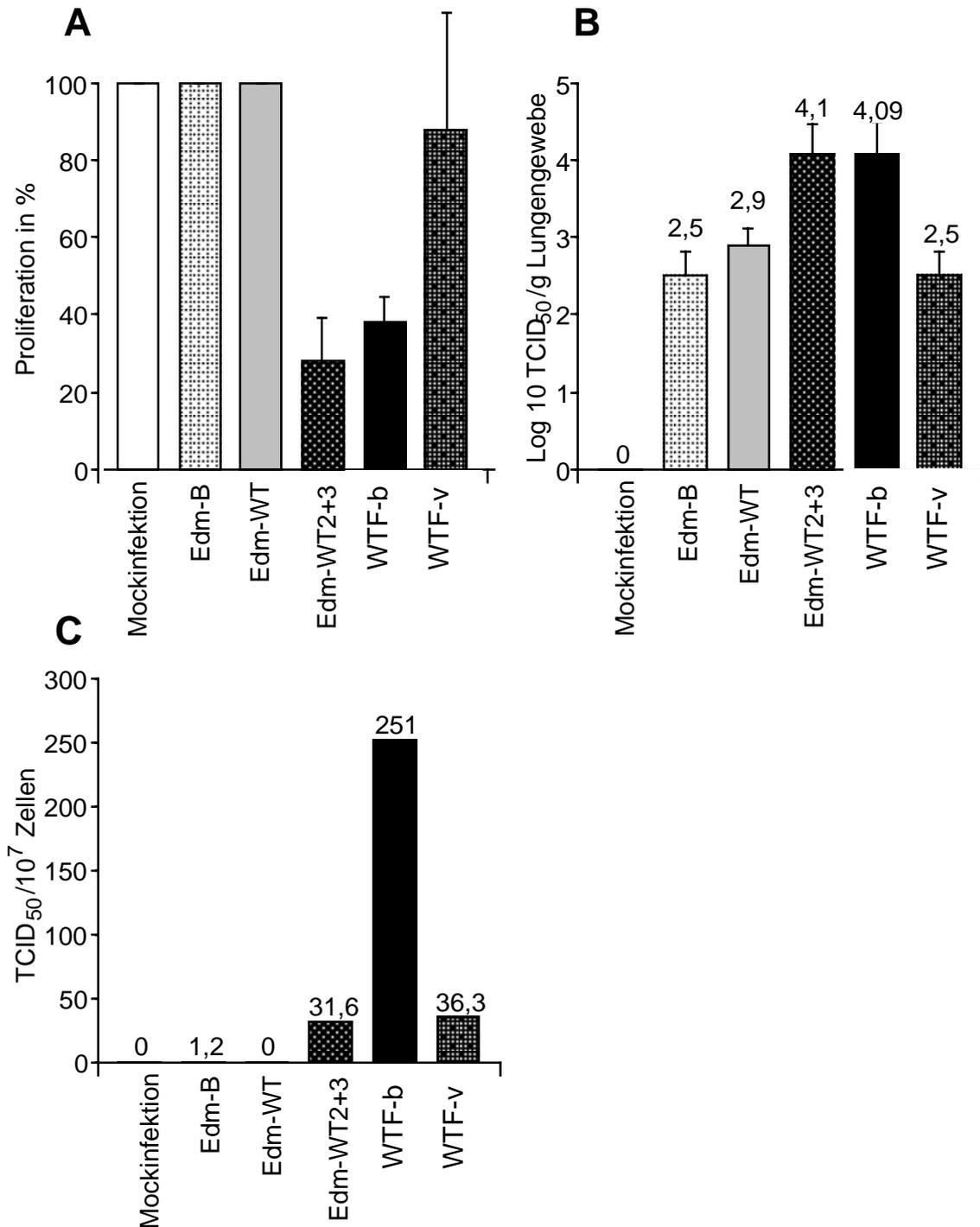


Abb. 4.7.: Vergleich zwischen unterschiedlich passagierten Wildtyp- und Impfstämmen.

Die Baumwollratten wurden mit unterschiedlich passagierten MV Wildtypen und Impfstämmen (10^5 i.n.) infiziert. Am Tag 4 p.i. wurden die Milzen und Lymphknoten entnommen. (A) Die Proliferation ist als Prozentsatz der Proliferation naiver Milzzellen (100%) dargestellt. Die Standardabweichung wurde als

Fehlerbalken angegeben. (B) Der Virustiter wurde als Log 10 TCID₅₀/g Lungengewebe dargestellt. (C) Die Lymphknotenzellen von 4 Tieren wurden vereinigt und der TCID₅₀/10⁷ Zellen bestimmt.

4.1.6. Die Bedeutung der viralen Glykoproteine für die Proliferationshemmung und Virusausbreitung in Baumwollratten

Wie bereits gezeigt worden ist, wird durch die Expression von MV H- und F-Protein auf der Oberfläche infizierter Zellen nach Kontakt mit T-Zellen deren Proliferation gehemmt. Diese Kontakt-vermittelte Proliferationsinhibition tritt nur auf, wenn beide Proteine auf der Oberfläche exprimiert werden. Obwohl hinsichtlich Proliferationsinhibition *in vitro* kein Unterschied zwischen Wildtypen und Impfstämmen gefunden wurde, treten dagegen *in vivo* deutliche Unterschiede auf. Es stellt sich die Frage, ob der auftretende proliferationshemmende Effekt bei einer *in vivo* WTF-Infektion durch die Oberflächenproteine H oder/und F vermittelt wird. Daher wurden verschiedene rekombinante Viren hinsichtlich Proliferationsinhibition und Ausbreitung in den drainierenden Lymphknoten getestet. Verglichen wurde Edm-NSE mit WTF und rekombinanten Viren, in dem im Edm-NSE-Hintergrund F, H oder F und H gegen die Glykoproteine des WTF-Stamm ausgetauscht wurden. In Bezug auf Proliferation wirken alle Viren, welche das H-Protein von WTF tragen, hemmend (Abb. 4.8. A, B). Das korreliert sehr gut mit der Ausbreitung in die drainierenden Lymphknoten. Im Gegensatz dazu verhalten sich die Viren, die H von Edm tragen in Bezug auf Proliferationshemmung und Ausbreitung wie typische Impfstämme (Abb. 4.8. A, B). Der Austausch von Edm F-Protein gegen WTF F-Protein scheint keinen Einfluß auf Proliferation und Ausbreitung auszuüben. Anscheinend ist das H-Protein wichtiger für den immunsuppressiven Effekt als das F-Protein.

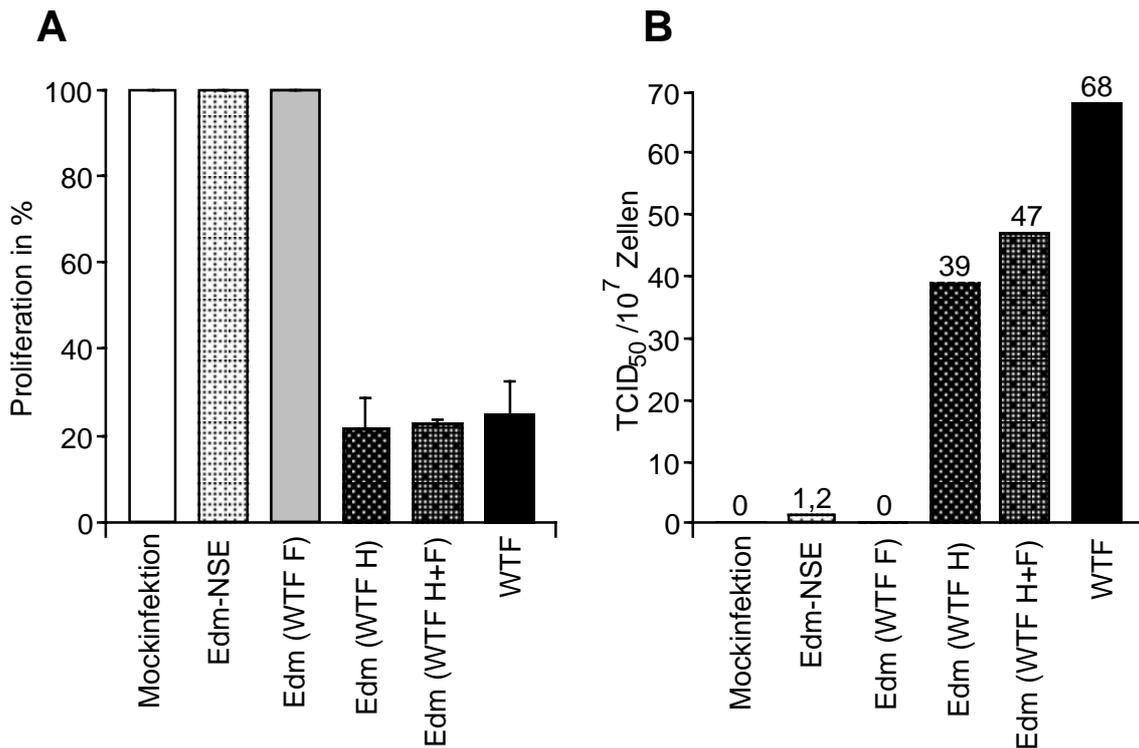


Abb. 4.8. Einfluß der F- und H-Proteine von rekombinanten Viren auf Immunsuppression und Ausbreitung.

Die Baumwollratten wurden mit rekombinanten MV (10^5 i.n.) infiziert. Am Tag 4 p.i. wurden die Milzen und Lymphknoten entnommen. (A) Die Proliferation ist als Prozentsatz der Proliferation naiver Milzzellen (100%) dargestellt. (B) Die Lymphknotenzellen von 4 Tieren wurden vereinigt und der TCID₅₀/10⁷ Zellen bestimmt.

4.1.7. Bedeutung der Punktmutation N481Y im H-Protein von WTF auf die phänotypischen Eigenschaften des Virus

Die Aminosäure-Position 481 im H-Protein scheint wichtig für die Rezeptornutzung zu sein. Die Impfstämme besitzen an dieser Stelle ein Arginin und binden an den zellulären Rezeptor CD46 und CD150. Im Gegensatz dazu enthalten Wildtypstämme Tyrosin und binden nur an den Rezeptor CD150. Um zu überprüfen, welche Bedeutung diese Position 481 *in vivo* hat, wurden zwei rekombinante Viren getestet. In diesen Viren wurde im Edm-

Hintergrund das Edm-H gegen WTF-H ausgetauscht. Zusätzlich wurde in einem Virus eine Rückmutation an Position 481 von Tyrosin zu Asparagin eingefügt (Ed(WTF-H) N481Y). Im Vergleich zu Ed (WTF-H) zeigte diese Rückmutante keine Immunsuppression, ließ sich nicht in den drainierenden Lymphknoten nachweisen und der Virustiter im Lungengewebe ($2,49 \log_{10} \text{TCID}_{50}$) ist vergleichbar mit Impfstämmen (Abb. 4.9). Das demonstriert, dass ein Aminosäureaustausch in Position 481 ausreichend ist, um den Phänotyp zu verändern, d.h. von einem immunsuppressiven, sich ausbreitenden zu einem nicht-immunsuppressiven, sich nicht ausbreitenden Phänotyp.

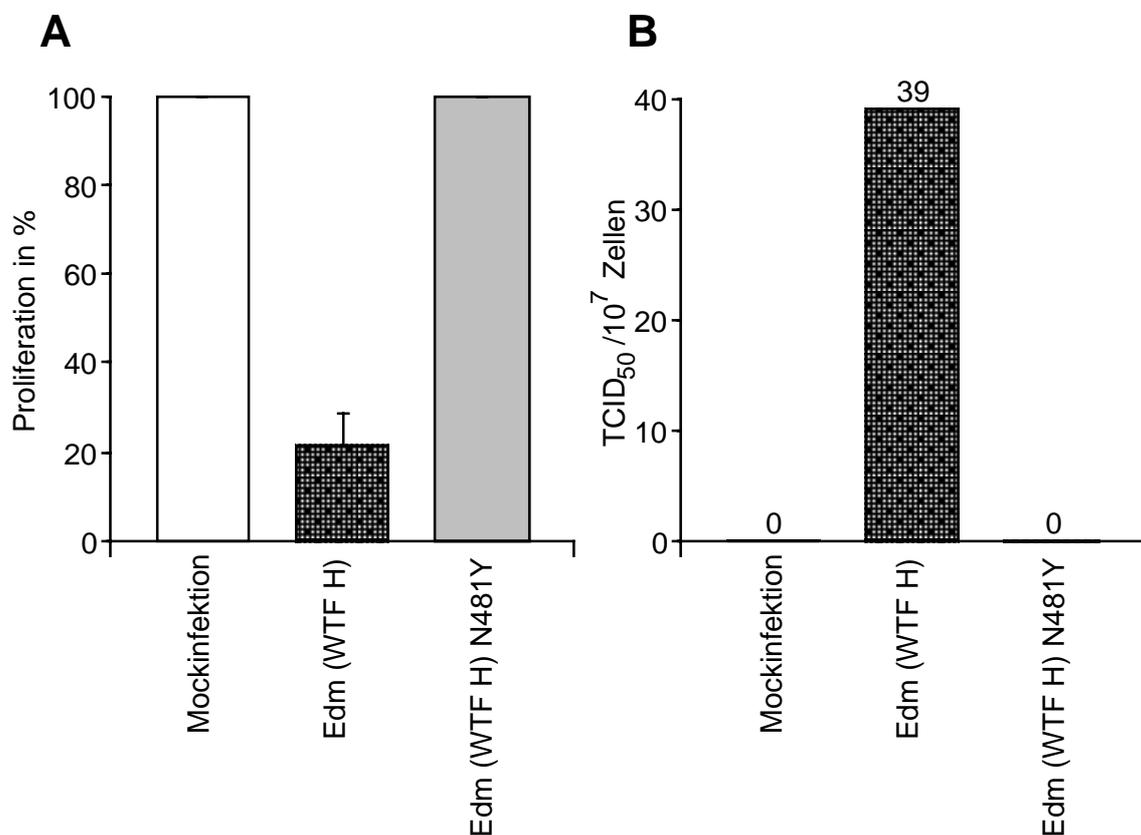


Abb. 4.9. Einfluß der Punktmutation N481Y im H-Protein von WTF.

Die Baumwollratten wurden mit Edm (WTF-H) N481Y und mit Edm (WTF-H) 10^5 i.n. infiziert. Am Tag 4 p.i. wurden die Milzen und Lymphknoten entnommen. (A) Die Proliferation ist als Prozentsatz der Proliferation naiver Milzzellen (100%) dargestellt. Die Standardabweichung wurde als Fehlerbalken angegeben. (B) Die Lymphknotenzellen von 4 Tieren wurden vereinigt und der $\text{TCID}_{50}/10^7$ Zellen bestimmt.

4.2. Rolle der Makrophagen bei der Induktion einer Immunsuppression im Modell der Baumwollratte

Das Atmungsepithel der Lunge wird durch das sogenannte bronchienassoziierte lymphatische Gewebe (BALT) geschützt. In diesem befinden sich neben Lymphozyten auch Makrophagen. Viele Krankheitserreger, besonders Viren, rekrutieren viele Makrophagen in die Lunge. Diese phagozytieren das Virus und präsentieren virales Antigen in den drainierenden Lymphknoten. Außerdem werden die Makrophagen häufig zur Produktion von IL-12 und INF-gamma angeregt. Diese wiederum wirken auf die Proliferation von CD4+-T-Zellen. Daher wurde untersucht, welche Rolle die Makrophagen während einer Masernvirus-Infektion im Baumwollrattenmodell spielen und ob Unterschiede zwischen Wildtyp- bzw. Impfstämmen zu beobachten sind.

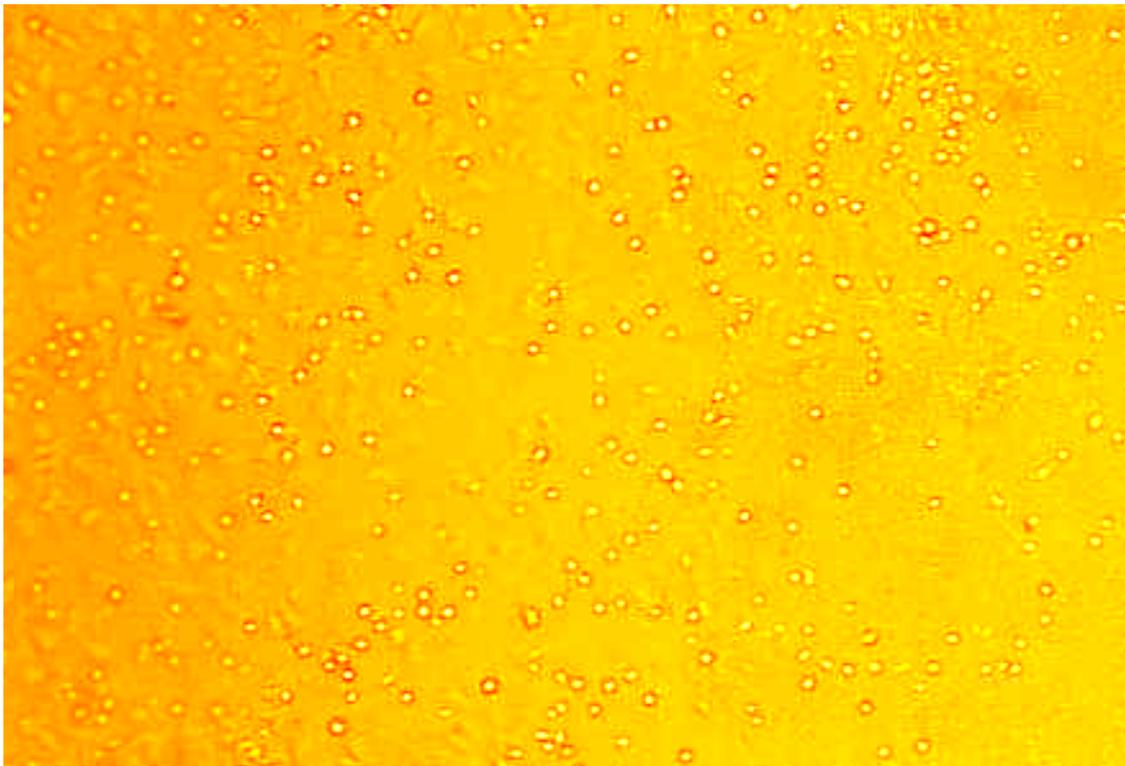


Bild 4.1: Dichter Zellrasen von Lungen-Lavage-Makrophagen

Die Makrophagen wurden von infizierten Tieren isoliert, nach 3-stündiger Adhärenz von anderen Zellen getrennt und für 4 Wochen in Kultur genommen.

4.2.1. Definition der Lungen-Lavage-Makrophagen

Nach der Masernvirus-Infektion wurde aus der Lungen-Lavage der Baumwollratten 3×10^6 Immunzellen pro Tier isoliert. Lichtmikroskopisch lassen sich die großen Zellen morphologisch als Makrophagen identifizieren, die sehr stark an der Oberfläche der Kulturflasche haften und nach 3-4 Wochen einen dichten Zellrasen ausbilden (Bild 4.1, Seite 58).

A

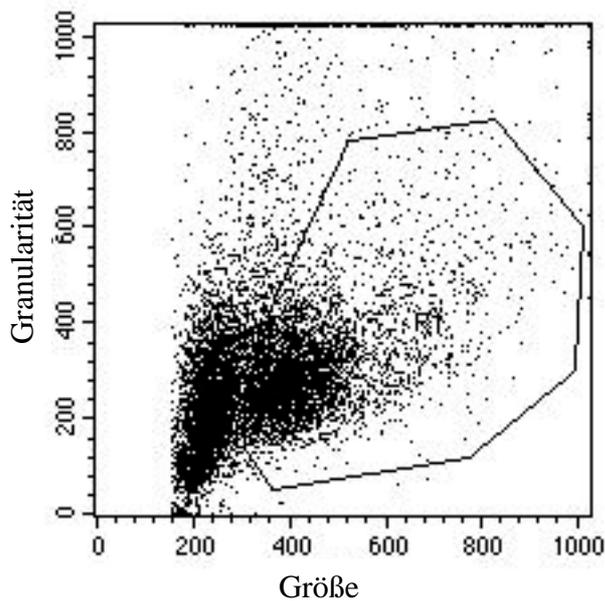
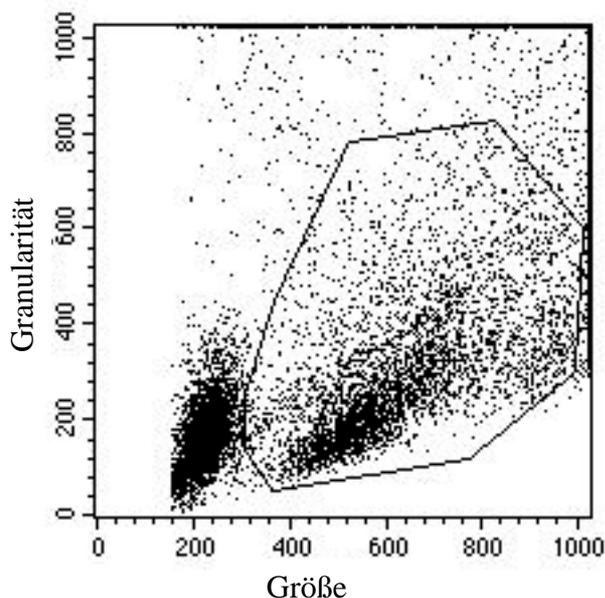


Abb. 4.10. Morphologie von Lungen-Lavage-Zellen nach der Infektion i.n. 10^5 TCID₅₀ Edm (WTF H+F)

Lungen-Lavage-Zellen wurden für eine durchflußzytometrische Analyse vorbereitet. Die Morphologie der Zellen wird über das Vorwärtsstreulicht (Größe) und das Seitwärtsstreulicht (Granularität) dargestellt.

B



(A) Region 1 definiert morphologisch intakte, nichtfixierte Makrophagen, deren Analyse mit FITC-makierten Antikörpern in Abb. 4.11. A, B, C und 4.12. A, B dargestellt ist.

(B) Region 1 definiert morphologisch intakte, fixierte und permeabilisierte Makrophagen, deren Analyse mit FITC-makierten Antikörpern in Abb. 4.12. C dargestellt ist.

Zur weiteren Charakterisierung der Lungen-Lavage-Zellen (Abb. 4.10. A, B) wurden die Zellen mit monoklonalen Antikörpern gegen CD59, MHC I und MHC II gefärbt und mit Hilfe der Durchflußzytometrie analysiert. Alle Lungen-Lavage-Zellen besitzen MHC I-Moleküle auf der Oberfläche, CD59 ist auf NK, Granulozyten, Erythrozyten, Makrophagen und B-Zellen vorhanden. Zusätzlich nur aktivierte Makrophagen, B-Zellen und Erythrozyten zeigen eine erhöhte Expression MHC-Molekülen der Klasse II. Durch Ausschlußverfahren lassen sich die großen, granuläre, intakte Zellen die CD59 und MHC-Molekülen der Klasse II exprimieren als Makrophagen definieren. (Abb. 4.11.).

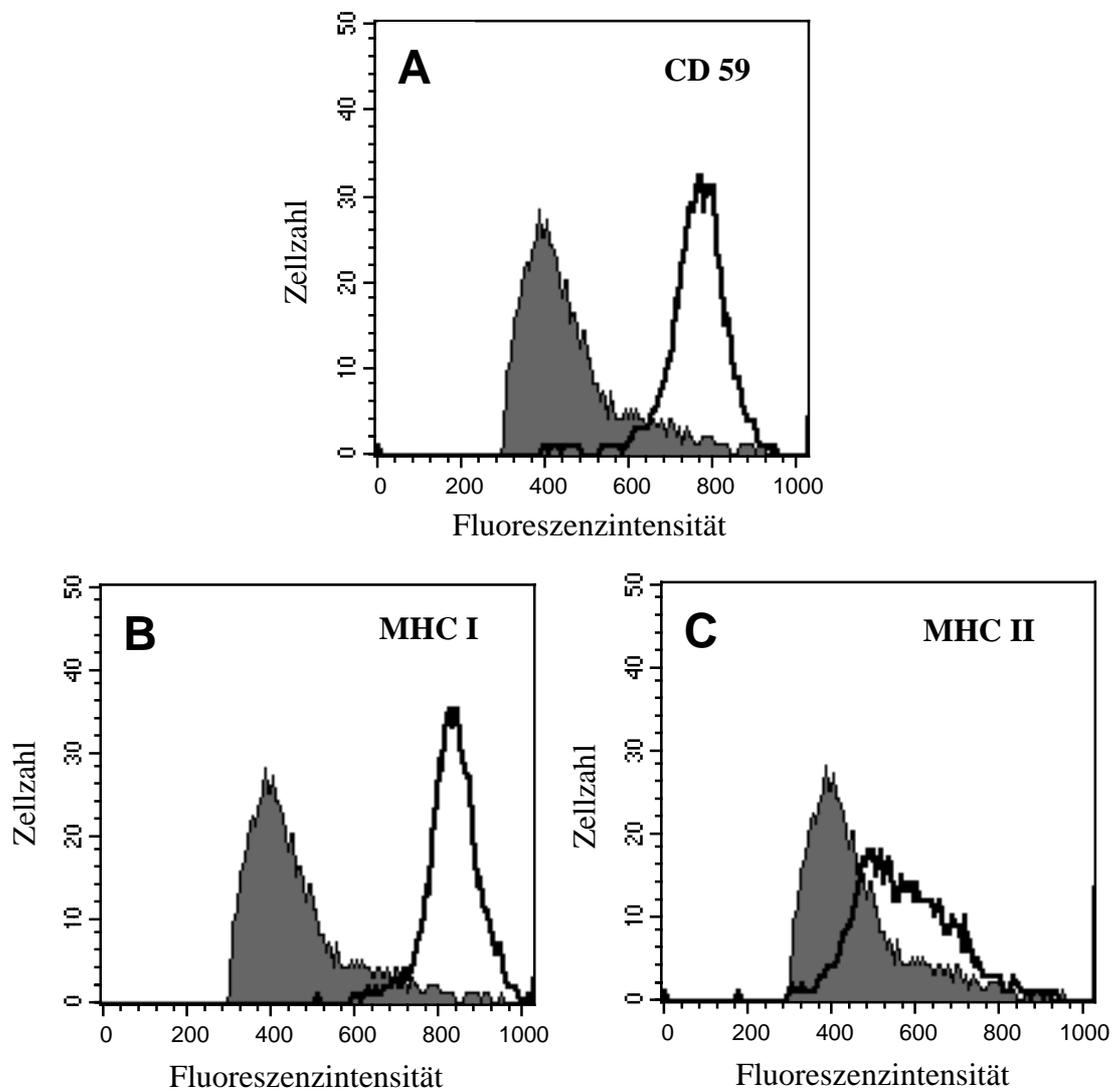


Abb. 4.11.: FACS-Analyse zur Charakterisierung der Lungen-Lavage-Makrophagen.

(A) Färbung gegen CD59, (B) gegen MHC I und (C) gegen MHC II. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für alle MV.

4.2.2. Durchflußzytometrische Analyse zur Untersuchung der Expression von F, H und N in Makrophagen aus der Lungen-Lavage MV-infizierten Baumwollratten

Nach durchgeführter Charakterisierung der infizierten Makrophagen wurden diese auf die Expression der viralen Proteine F, H und N untersucht. Der Nachweis erfolgte durchflußzytometrisch mit monoklonalen Antikörpern gegen die MV-Proteine. Die Proteine F und H wurden nachgewiesen und zusätzlich konnte nach Fixierung mit Formaldehyd und anschließender Permeabilisierung mit Triton-X100 intrazelluläres N-Protein detektiert werden. (Abb 4.12.)

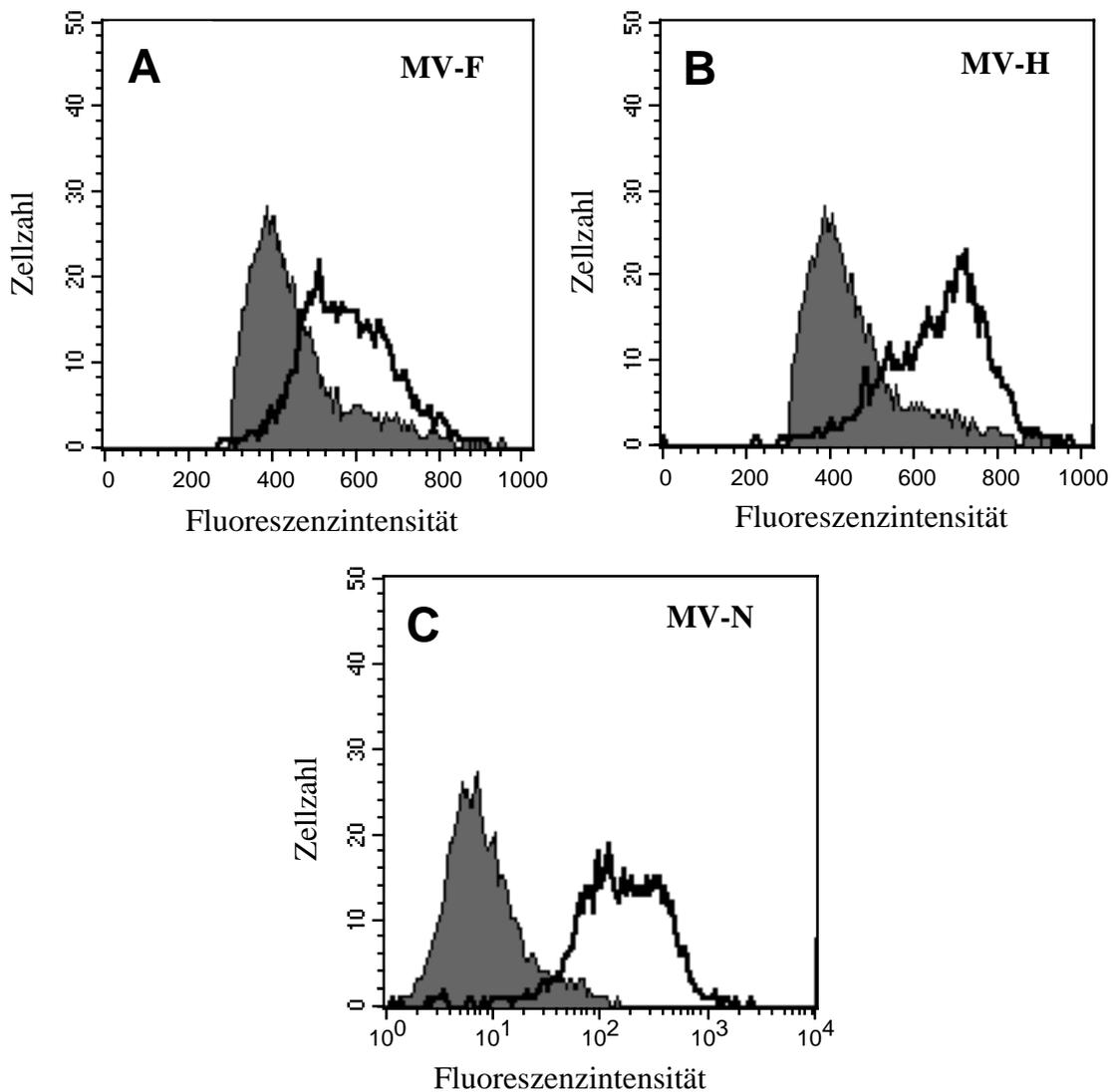


Abb. 4.12. FACS-Analyse zum Nachweis der viralen Proteinexpression

(A) Färbung gegen Oberflächenprotein F (B) gegen H und (C) gegen intrazelluläres N-Protein. Das gezeigte Experiment ist repräsentativ für alle MV.

4.2.3. Virusreplikation von GFP-MV

Zum Nachweis der Proteinexpression von MV in Makrophagen wurden die Tiere intranasal mit einem rekombinanten GFP-exprimierenden MV infiziert. Die Expression von GFP diente als Nachweis für Virus-positive Zellen und konnte mit einem Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden (Bild 4.2.).

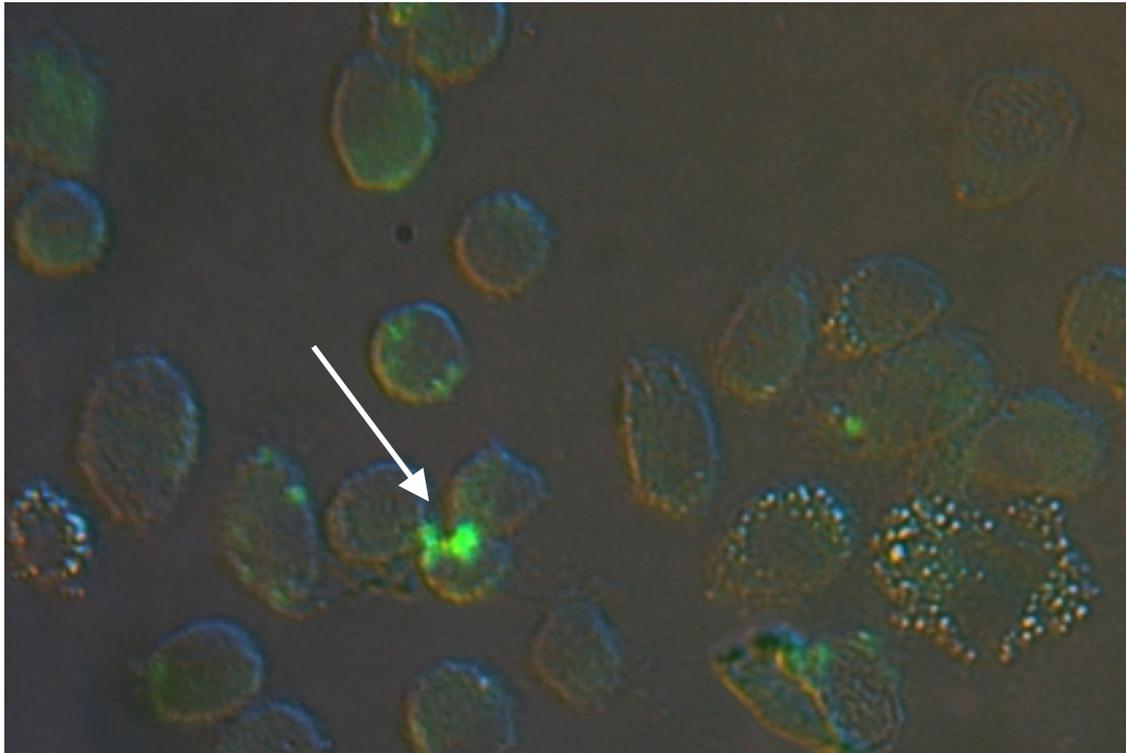


Bild 4.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von infizierten Makrophagen.

Makrophagen nach 4 Tage p.i. und 3-stündiger Adhärenz. Der Pfeil zeigt GFP-exprimierende Zellen als Nachweis der viralen Proteinexpression.

4.2.4. Infektion von Makrophagen

Nach Charakterisierung der isolierten Makrophagen und Nachweis der Virusproteine wurde das Virus rückisoliert, um die Replikationseffizienz zu ermitteln. Bekannte Methoden für die Rückisolierung von Viren sind das Homogenisieren bzw. Frieren-Tauen infizierter Zellen. Allerdings kann ohne Indikatorzellen von MV-infizierten Makrophagen kein Virus gewonnen werden. Nach der Kokultivation von infizierten

Makrophagen mit B95a als Indikatorzellen lässt sich der Virustiter sehr gut bestimmen. Dafür wurden die Makrophagen wie bereits beschrieben isoliert und mit B95a-Zellen kokultiviert.

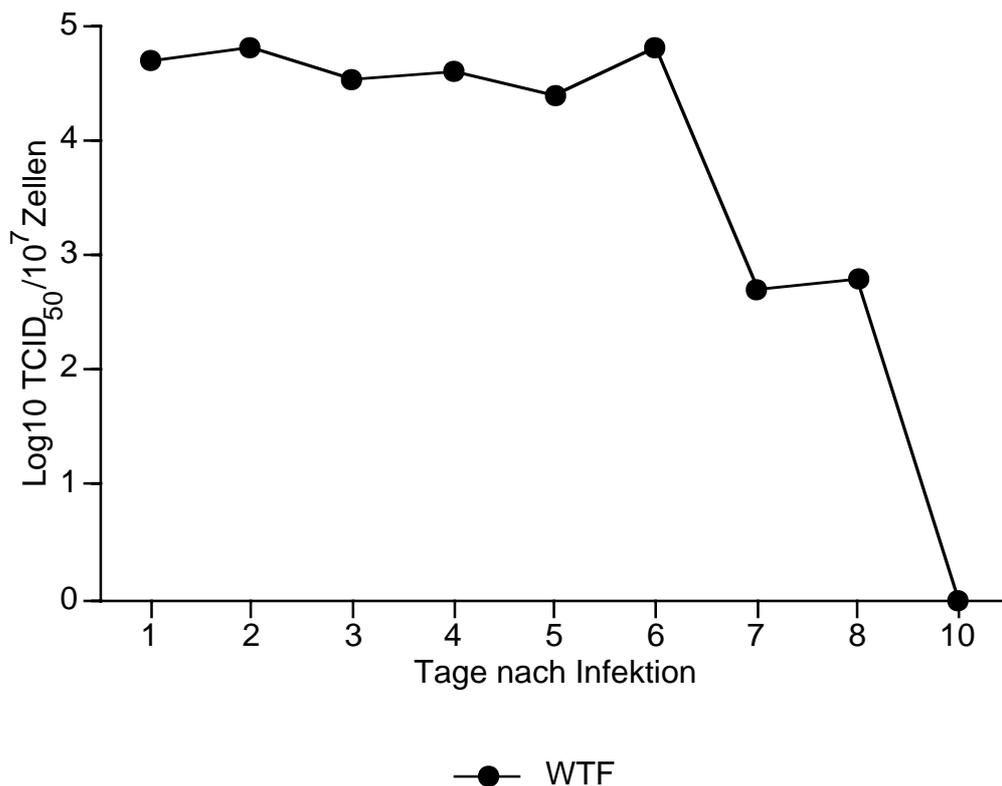


Abb. 4.13.: Bestimmung des Virustiters von infizierten Makrophagen.

Die Tiere wurden intranasal mit 10^5 TCID₅₀ WTF infiziert. Der TCID₅₀ wurde anhand von Kokultivation von Makrophagen mit B95a-Zellen bestimmt.

Bereits am Tag 1 nach der Infektion zeigt WTF einen sehr hohen Virustiter von TCID₅₀ $4.7 \log/10^7$ Zellen (Abb. 4.13). Dieser Titer bleibt auf gleichem Niveau für 6 Tage bestehen. Danach fiel der Titer ab und ließ sich ab dem 10. Tag nicht mehr nachweisen.

4.2.5. *In vivo* Persistenz von Masernvirus in Makrophagen nach Infektion mit WTF und Edm (Fusion in Zellkultur)

Um zu prüfen, wie lange eine Infektion mit WTF bzw. Edm in infizierten Makrophagen nachweisbar ist, wurde zu verschiedenen Zeitpunkten eine Lungenlavage durchgeführt. Ein Teil der Makrophagen wurde zur Bestimmung des TCID₅₀ eingesetzt (siehe 4.2.3.1.). Parallel dazu wurden weitere Zellen für 5-6 Wochen in Kultur genommen, um die Ausprägung des zytopathischen Effektes zu bestimmen (Bild 4.3).

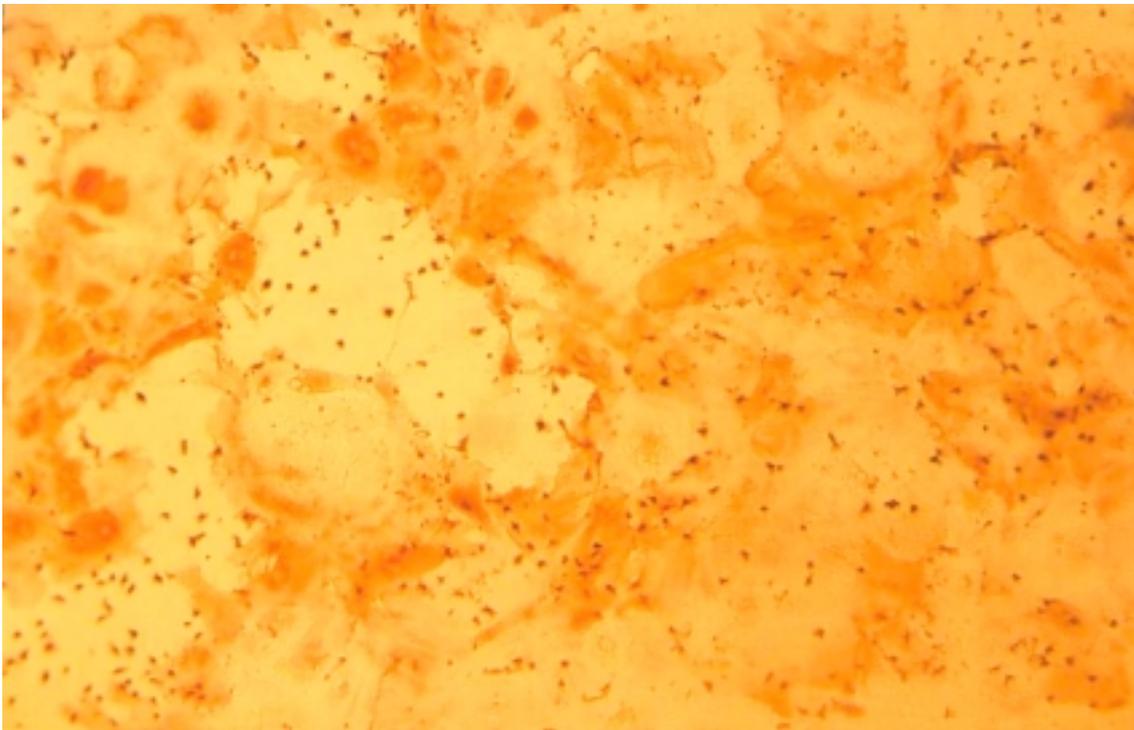


Bild 4.3: Synzytienbildung in Zellkultur.

CPE 4 Tage nach der Infektion mit Edm und 5 Wochen in Zellkultur.

Die Kinetik der Synzytienbildung von Edm- bzw. WTF-infizierten Makrophagen ist in Tab. 4.1 zusammengefaßt. Wie gezeigt, läßt sich der Virus nach Kokultivation mit WTF-infizierten Makrophagen ab dem 10. Tag nach der Infektion nicht mehr

nachweisen. Kultiviert man allerdings die Makrophagen ohne Indikatorzellen bilden diese bis zu Tag 12 einen dichten Zellrasen mit einem CPE aus. Am Tag 14 bildet sich kein dichter Zellrasen mehr, aber einzelne Makrophagen zeigen einen CPE. Im Gegensatz dazu bildet sich ab Tag 10 nach der Infektion mit Edm kein dichter Zellrasen und kein CPE.

Tage	1	2	3	4	5	6	7	8	10	12	14
WTF	***	***	***	***	***	***	***	**	*	*	-
Edm	nb	nb	nb	***	nb	nb	**	nb	-	nb	-

Tab. 4.1: Kinetik der Synzytienbildung nach der Infektion mit WTF und Edm.

(***) dichter Zellrasen mit CPE

(**) Zellrasen mit CPE

(*) einzelne Makrophagen mit CPE

(nb) nicht bestimmt

(-) keine Makrophagen isolierbar.

4.2.6. Korrelation des immunsuppressiven Effektes nach Infektion mit WTF und Edm

Virus-infizierte Makrophagen wandern in die drainierenden Lymphknoten. Dadurch kann das Virus in die Lymphknoten gelangen und sich somit über die Lymphgefäße im gesamten Organismus ausbreiten. Wie im Abs. 4.2.2. beschrieben, tragen infizierte Makrophagen die viralen Glykoproteine H und F auf der Oberfläche, die für eine Proliferationsinhibition der T-Zellen verantwortlich sind. Es wurde untersucht, ob infizierte Makrophagen *ex vivo* Unterschiede in Immunsuppression zwischen Wildtypen und Impfstämmen zeigen. Die aus der Lunge isolierten, adherenten Makrophagen wurden mittels Durchflußzytometrie hinsichtlich der Expression der

Oberflächenproteine H und F untersucht. In 90% der WTF- und Edm-infizierten Makrophagen konnte H und F nachgewiesen werden. Die Makrophagen wurden anschließend mit nicht-infizierten Milzzellen aus der Baumwollratte in verschiedenen Verhältnissen kokultiviert und mit Mitogen stimuliert (Abb. 4.14.). Es wurde beobachtet, dass WTF-infizierte Makrophagen konzentrationsabhängig die Proliferation der Milzzellen hemmen. Im Gegensatz dazu induzieren Edm-infizierte Makrophagen keine Proliferationsinhibition.

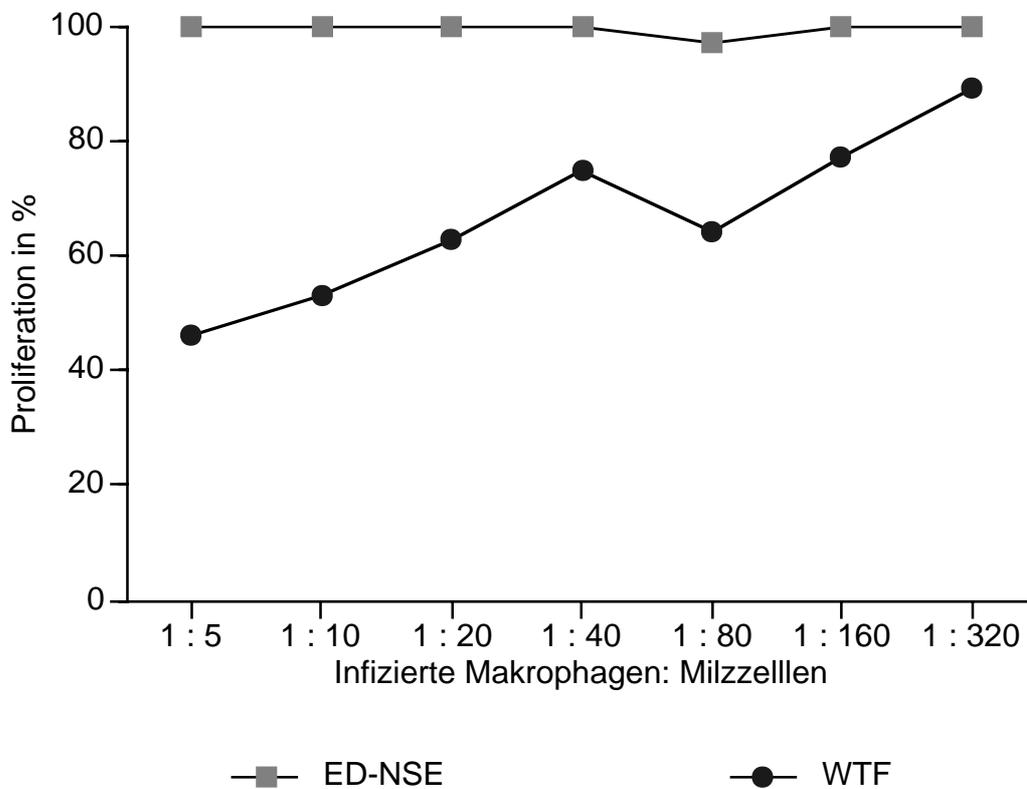


Abb. 4.14. Verlauf der Proliferationsinhibition von Milzzellen nach Kontakt mit WTF und Edm infizierten Makrophagen.

Die Tiere wurden mit einer $TCID_{50}$ von 10^5 mit WTF und Edm infiziert. Die aus der Baumwollratte isolierten, adherenten Makrophagen wurden in verschiedenen Verhältnissen zu den Milzzellen eingesetzt, kokultiviert und mit Concavalin A ($2.5 \mu\text{g/ml}$) stimuliert. Nach 72h Inkubation wurde der Einbau von ^3H -Thymidin gemessen. Die Daten repräsentieren eines von vier durchgeführten Experimenten.

4.2.7. Kinetik der Zytokin-Sekretion von WTF und Edm-infizierten Makrophagen

Anschließend wurde untersucht, ob dieser Effekt durch lösliche Faktoren (Zytokine) ausgelöst wird. Es wurde die Sekretion einer Reihe von Interleukinen und Chemokinen untersucht, die von Makrophagen sezerniert werden und in Tab. 4.2 aufgelistet sind. Mit Ausnahme der IL-12-Expression konnte kein Unterschied zwischen Infektion mit WTF und Edm gefunden werden. IL-12 ist nur biologisch aktiv, wenn beide Untereinheiten (p35 und p40) exprimiert werden. Die Unterschiede am Tag 8 und 10 p.i. zwischen WTF und Edm wurden in Tab. 4.2 zusammengefaßt. In Edm-infizierten Makrophagen läßt sich die Expression beider Ketten nachweisen, allerdings nicht in WTF-infizierten Makrophagen. Da IL-12 die Sekretion von INFgamma stimuliert, könnte eine Inhibierung der Expression einen Einfluß auf die Immunreaktion gegen sekundäre Infektionen haben.

Zytokine	Tag 4		Tag 6		Tag 8		Tag 10	
	WTF	Edm	WTF	Edm	WTF	Edm	WTF	Edm
IL1α	+	+	+	+	+	+	+	+
IL1β	+	+	+	+	+	-	-	-
IL6	-	-	-	-	-	-	+	+
IL18	+	+	+	+	+	+	+	+
IL12p35	-	-	+	+	-	+	-	+
IL12p40	+	+	+	+	-	+	-	+
MIP1α	+	+	+	+	+	+	+	+
MIP1β	+	+	+	+	+	+	-	+
MIP2	+	+	+	+	+	+	+	+
TNFα	+	+	+	+	+	+	+	+
RANTES	+	+	+	+	+	+	+	+
IP10	-	-	-	-	+	-	-	-
Gro	-	-	+	+	+	+	+	+
GAPDH	+	+	+	+	+	+	+	+

Tab. 4.2: Zytokin-Sekretion von infizierten Makrophagen.

Die Expression wurde mit RT-PCR nachgewiesen. Die Makrophagen wurden am Tag 4, 6, 8 und 10 getestet.

(+) nachweisbar

(-) nicht nachweisbar

5. Diskussion

Die akuten Masern induzieren in Patienten eine ausgeprägte Immunsuppression, die häufig zu mikrobiellen Sekundärinfektionen und damit verbunden, besonders in den Entwicklungsländern, zu Todesfällen führt (KATZ 1995). Die zu Grunde liegenden Mechanismen konnten bislang nur *in vitro* oder anhand von Patientenproben untersucht werden.

Ein geeignetes Tiermodell stand nicht zur Verfügung, weil Masernvirus in (den häufig experimentell eingesetzten) Nagetieren nicht im Respirationstrakt repliziert und Affen aus ethischen und finanziellen Gründen nicht in ausreichender Menge zur Verfügung stehen. Mit dem Baumwollrattenmodell (*Sigmodon hispidus*) steht jetzt ein mikrobiologisch definiertes Inzucht-Nagetiermodell zur Verfügung, in dem Masernvirus repliziert und eine Immunsuppression auslöst (WYDE et al. 1992; NIEWIESK et al 1997).

Da bis vor Kurzem zur Untersuchung der Immunsuppression kein geeignetes Tiermodell zur Verfügung stand, wurden Versuche zur Immunsuppression *in vitro* durchgeführt und auf die Frage der Proliferationshemmung verkürzt. Dabei sind zwei Ansätze zu unterscheiden: 1. Infektion von PBL in Gewebekultur und Stimulation mit Mitogen. 2. Infektion von lymphoiden Zellen, die danach durch UV-Licht inaktiviert werden. Diese setzen kein infektiöses Virus mehr frei und tragen auf der Oberfläche die viralen Glykoproteine. Nach Mischung mit PBL werden diese mit Mitogen stimuliert. Unabhängig von der Art des Ansatzes konnte eine starke Suppression der Mitogenvermittelten Proliferation festgestellt werden, die sich auf einen durch die viralen Glykoproteine verursachten Zellzyklusarrest zurückführen ließ (MC CHESNEY et al. 1987, MC CHESNEY et al. 1988, YANAGI et al. 1992, SCHNORR et al. 1997; NANICHE et al. 1999; ILONEN et al. 1988; SCHLENDER et al. 1996). Allerdings kommt es mit diesen *in vitro* Systemen unabhängig von dem verwendeten Virus (Wildtyp- oder Impfvirus) zu einer Proliferationshemmung (SCHLENDER et al. 1996). Diese Daten decken sich mit den Untersuchungen im Baumwollrattensystem. Nach Kontakt mit infizierten, UV-inaktivierten CR-T2 Zellen werden Milzzellen in ihrer Proliferation unabhängig vom Virustyp gehemmt (Abb.4.1).

Klinisch gesehen kommt es aber nur nach Infektion mit dem Wildtypvirus und nicht nach Impfung zu Sekundärinfektionen. Aufgrund der *in vitro* Daten müsste man annehmen, dass immer nach Kontakt mit den viralen Glykoproteinen eine Proliferationshemmung auftritt (SCHLENDER et al. 1996; SCHNORR et al. 1997; ENGELKING et al. 1999), und Unterschiede im Patienten zwischen Wildtyp- und Impfvirus auf andere Faktoren zurückzuführen sein müssten. Die an Patienten durchgeführten Untersuchungen ergeben dabei kein klares Bild. Eine Hemmung der Proliferation von PBL *ex vivo* von Infizierten wie auch Vakzinierten ist häufig beschrieben worden (ARNEBORN u. BIBERFELD 1983; GRIFFIN et al. 1994:). Allerdings wurden diese Untersuchungen nicht vergleichend mit infizierten und immunisierten Patienten durchgeführt. Zudem wurde nicht bestimmt, um welche Wildtypvirusisolate es sich handelte und die Infektionsdosen konnten naturgemäß nicht bestimmt werden. Aus diesem Grund sind die in der Baumwollratte erhobenen Daten wertvoll, da sie einen Vergleich von Wildtyp- und Impfvirus bei definierter Virusmenge und genetischem Hintergrund der Tiere möglich machen (Abb.4.2).

Frühere Untersuchungen in Baumwollratten hatten bereits gezeigt, dass mit einer sehr hohen Dosis Impfvirus eine Proliferationshemmung in Milzzellen *ex vivo* induziert werden konnte (NIEWIESK et al. 1997). In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine 1000fach geringere Dosis von Wildtypvirus den gleichen immunsuppressiven Effekt hat wie diese hohe Dosis Impfvirus (Abb.4.5A). Das scheint zum einen an der wesentlich höheren Replikationsrate von Wildtypvirus in der Baumwollratte zu liegen und zum anderen an der Ausbreitung von Wildtypvirus in die drainierenden Lungenlymphknoten (Abb.4.5B).

Auch beim Menschen gibt es Hinweise, dass die Virusbelastung und –ausbreitung nach Wildtypinfektion sehr viel höher ist als nach Vakzinierung (KATZ 1995). Obwohl mit Hilfe der RT-PCR virale RNS nach Vakzinierung im Urin nachgewiesen werden kann, kann kein infektiöses Virus vom Impfling isoliert werden und er ist nicht infektiös (ROTA et al. 1995). An klinischen Symptomen ist höchstens ein leichter Temperaturanstieg zu beobachten. Im Gegensatz dazu kann nach Wildtypinfektion Virus aus dem Urin und Abstrichen des Respirationstraktes isoliert werden und infizierte PBL exprimieren Virusproteine (MOENCH et al. 1988; IHARA et al. 1992;

NAKAYAMA et al. 1995). Infektionen des Schleimhautepithels (Kopliksche Flecken) und des Hautepithels (Exanthem) sind klinisch sichtbar (KATZ 1995). Ähnlich ist die Situation beim Affen, wo nach Wildtypvirusinfektion eine höhere Virusmenge im Blut und der Lungenlavage nachgewiesen werden konnte. Wie beim Menschen führt auch nur die Infektion mit dem Wildtypvirus zum typischen Exanthem (VAN BINNENDIJK et al. 1997; POLACK et al. 1999; POLACK et al. 2000).

Eine stärkere Virusausbreitung nach Wildtypvirusinfektion ist auch im Baumwollrattenmodell beschrieben worden (WYDE et al. 1998). Nach Infektion von Baumwollratten mit einem genetisch nicht näher definierten Isolat aus Afrika konnte in 2/16 Fällen Virus in der Milz und in 9/16 Fällen Virus in den drainierenden Lungenlymphknoten nachgewiesen werden. Möglicherweise handelt es sich bei der Disseminierung von Virus in die Milz um eine Besonderheit dieses Isolates, da in den vorliegenden Untersuchungen mit einer Vielzahl von Wildtypisolaten nie Virus in der Milz gefunden wurde. Im Gegensatz dazu wurde die Ausbreitung von Virus in die drainierenden Lungenlymphknoten bestätigt und korrelierte sehr gut mit der in den Milzzellen induzierten Proliferationshemmung (Abb.4.4A,B; Abb.4.6A,B). Impfvirus war dagegen fast nicht in den Lungenlymphknoten nachweisbar. Interessanterweise war nach Infektion mit einer sehr hohen Dosis Impfvirus dieses in den Lungenlymphknoten nachweisbar, wenn auch nur an Tag 2 p. inf., während Wildtypvirus von Tag 2 bis 4 p. inf. nachweisbar war (Abb.4.4B). Das weist darauf hin, dass Impfvirus nur in den Lymphknoten gelangt, wenn es im massiven „Überschuß“ in der Lunge vorliegt.

Wie die Studien mit den rekombinanten Viren, bei denen die Glykoproteine des Impfstammes gegen die des Wildtypstammes WTF ausgetauscht waren, gezeigt haben, ist für die Virusausbreitung und für die Immunsuppression das Hämagglutininprotein von entscheidender Bedeutung (Abb.4.8A,B). Obwohl *in vitro* Studien (SCHLENDER et al. 1996) und *in vivo* Studien (NIEWIESK et al. 1997) mit transfizierten Zelllinien gezeigt haben, dass sowohl das Hämagglutininprotein als auch das Fusionsprotein notwendig für die Proliferationsinhibition sind, ist das Hämagglutinin offensichtlich wichtiger

Eine mögliche Erklärung dafür ist die unterschiedliche Rezeptornutzung durch das Hämagglutinin von Wildtyp und Impfstamm. Während das Wildtypvirus *in vitro* an

humanes CD150 bindet, nutzt das Impfvirus-hämagglutinin sowohl humanes CD150 als auch (mit vermutlich höherer Affinität) humanes CD46 (ERLENHOEFER et al. 2001; ERLENHOEFER et al. 2002). Das CD150 Molekül ist ein Aktivierungsmarker auf lymphoiden Zellen, während CD46 als Komplementschutzprotein auf allen Körperzellen vorkommt. Impfviren wurden durch Passage auf Fibroblasten gezüchtet, welche kein CD150, sondern nur CD46 exprimieren. Aufgrund von Mutationen im Hämagglutinin kam es zur Änderung in der Rezeptornutzung (und somit zum Überleben des Virus in Zellkultur (RIMA et al. 1997)). Eine Rückisolierung von Masernvirus auf lymphoiden Zellen verläuft innerhalb von Tagen, während eine Rückisolierung auf Fibroblasten einige Wochen dauert. Bereits durch Sequenzvergleiche konnte gezeigt werden, dass sich Wildtyp- und Impfstämme immer in drei Aminosäuren unterscheiden (Position 211 Wildtyp Serin zu Impfstamm Glyzin; Position 243 Glyzin zu Arginin und 481 Asparagin zu Tyrosin) (BARTZ et al. 1996; RIMA et al. 1997)

Nachfolgende Untersuchungen mit isoliert exprimierten Mutanten des Hämagglutininproteins konnten zeigen, dass die Aminosäuren an Position 481 *in vitro* für den Kontakt mit humanem CD150 bzw humanem CD46 verantwortlich sind (BARTZ et al. 1996). Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass ein rekombinantes Virus, welches das Wildtyp-hämagglutinin von WTF exprimiert, an humanes CD150 bindet und bereits eine einzige Mutation an Aminosäureposition 481 von Tyrosin zu Asparagin die Rezeptornutzung zu humanem CD46 hin ändert (ERLENHOEFER et al. 2002). Dieses Viruspaar verhält sich auch in der Baumwollratte unterschiedlich und lässt sich *in vivo* als ausschließlich CD150-bindende Variante mit starker Immunsuppression und Virusausbreitung und als CD46 und CD150-bindende Variante mit schwacher Immunsuppression und ohne Virusausbreitung definieren (Abb.4.9A,B). Allerdings scheint die Wirkung der Aminosäure 481 auch Kontext-abhängig zu sein, da das experimentell adaptierte WTFv keine Mutation an Position 481 trägt, sondern an Aminosäure Position 546.

In der Baumwollratte kann nicht nur die Rezeptornutzung untersucht werden, sondern auch die Pathogenität von Isolaten verschiedener Herkunft. Die im Affen und im Menschen pathogenen Isolate Bilthoven und ICB (AUWAERTER et al. 1999, KOBUNE et al. 1996) breiten sich auch in der Baumwollratte aus und induzierten eine

starke Immunsuppression (Abb.4.6A,B). Im Gegensatz dazu war das Wildtypvirus WTFv, das über Verozellen passagiert worden ist, nicht pathogen (Abb.4.7.A,B,C). Interessant war auch die Beobachtung, dass Edmonston (wt), das Vorläufervirus aller Impfstämme, in der Baumwollratte wie im Affen stark attenuiert war (ROTA et al. 1994). Nach zweimaliger Tierpassage konnte eine Variante gewonnen werden, die wieder pathogen war (Abb.4.7.A,B,C). Mit Hilfe dieser Variante könnte jetzt detailliert untersucht werden, welche Proteine neben dem Hämagglutinin einen Beitrag zur Virulenz von Masernvirus leisten können.

Es ist z. B. beschrieben worden, dass für die Funktionsfähigkeit des Virus das V-Protein im Baumwollrattenmodell (TOBER et al. 1998), das C-Protein in Affenmodell (TAKEUCHI et al. 2000) und die Fähigkeit des Nukleokapsidproteins, Hitzeschockproteine zu binden, *in vitro* essentiell sind (ZHANG 2002). Darüber hinaus konnte mit Hilfe eines Replikationsystems *in vitro* gezeigt werden, dass sich die Polymerasen von Wildtypvirus und Impfstämmen in ihrer Effizienz unterscheiden (BANKAMP et al. 1999).

Nach den Daten aus dem Baumwollrattenmodell scheint es wahrscheinlich, dass die Nutzung der zwei verschiedenen humanen Rezeptormoleküle *in vitro* mit der Ausbreitung in Baumwollratten korreliert. Eine mögliche Erklärung wäre, dass Viren, die CD46 nutzen können, an jede Zelle binden können, während Viren, die CD150 nutzen, gezielt die für den Transport in lymphoide Organe notwendigen dendritischen Zellen und Makrophagen infizieren. Darauf weisen auch Versuche hin, die zeigen konnten, dass dendritische Zellen sich *in vitro* besser mit Wildtypvirus als mit Impfvirus infizieren lassen (OHGIMOTO et al. 2001). Obwohl *in vitro* gezeigt werden konnte, dass dendritische Zellen prinzipiell mit Masernvirus infiziert werden können (FUGIER-VIVER et al. 1997; GROSJEAN et al. 1997; KLAGGE et al. 2000), gibt es noch keine *in vivo* Evidenzen.

Im Gegensatz dazu ist mehrfach beschrieben worden, dass in Patienten Makrophagen während der akuten Masern infiziert sind (ESOLEN et al. 1993; NAKAYAMA et al. 1995). Es ist unklar, ob es sich hier um ein Reservoir für die Virusreplikation handelt, da auch *in vitro* infizierte humane Makrophagen nur schlecht Masernvirus replizieren. Ebenso wie beim Menschen findet man in Baumwollratten nach Infektion Masernvirus-

infizierte Makrophagen (Bild 4.1; Abb.4.10; Abb.4.11).

Diese nach Lungenlavage erhaltenen Zellen exprimieren Masernvirusproteine (Abb.4.12). Allerdings kann Virus aus ihnen nur nach Kokultivierung gewonnen werden und die Versuche mit dem GFP-exprimierenden Virus zeigen, dass die Replikation eingeschränkt ist (Bild 4.2). Da ebenfalls im Baumwollrattenmodell gezeigt werden konnte, dass vorwiegend die T-Zellantwort durch die Masernvirusinfektion supprimiert wird (NIEWIESK et al. 2000), liegt die Vermutung nahe, dass infizierte Makrophagen als Antigen-präsentierende Zellen in ihrer Funktion gestört sein könnten. *In vitro* konnte gezeigt werden, dass Zellen einer humanen Makrophagenzelllinie, die mit Masernvirus infiziert waren, eine verstärkte IL-1 Sekretion und eine verminderte TNF Sekretion aufwiesen. Außerdem konnte man eine erhöhte Expression von MHC II auf der Zelloberfläche nachweisen. Von den infizierten Zellen wurde Masernvirus normal, Drittantigene aber nur sehr schlecht T-Zellen präsentiert (LEOPARDI et al. 1992; LEOPARDI et al. 1993).

Bei Baumwollrattenmakrophagen wurde *ex vivo* eine starke Expression von MHC I und II gefunden (Abb.4.11B,C). Ob die eigentliche Antigenpräsentation dieser Zellen beeinträchtigt ist, muss allerdings noch untersucht werden. Allerdings war im Unterschied zu infizierten CR-T2 Zellen zu beobachten, dass mit dem Wildtyp infizierte Makrophagen die Proliferation von Milzzellen hemmten, während die mit dem Impfstamm infizierten Makrophagen diese Hemmung trotz Expression der gleichen Menge an Glykoproteinen nicht zeigten (Abb.4.14).

Möglicherweise spielen hier von den Makrophagen sezernierte Zytokine eine Rolle. Ein Hinweis auf die immunmodulatorische Rolle von humanen Makrophagen ist der Befund, dass nach Infektion die Sekretion von IL-12 durch diese herabgesetzt ist (KARP et al. 1996). Da IL-12 eine wichtige Rolle bei der Generierung von Th1 Zellen spielt, könnten diese Befunde die Hypothese stützen, dass die während der Masernvirusinfektion zu beobachtende Immunsuppression auf die Entwicklung einer Th2 Antwort zurückzuführen sei (GRIFFIN et al. 1993).

In Rhesusaffen, die mit Masernviruswildtyp infiziert waren, konnte eine reduzierte IL-12 Sekretion festgestellt werden (POLACK et al. 2002). In Patienten wurde keine Erniedrigung der Serumkonzentration gefunden, sondern eine relative Abnahme von IL-

IL-12 produzierenden Makrophagen. Nach Infektion verdreifachte sich die Zahl der Makrophagen im Blut, während die Zahl der IL-12 produzierenden Makrophagen gleich blieb (ATABANI et al. 2001).

Auch in der Baumwollratte ließ sich ein deutlicher Unterschied in der IL-12 Produktion nach Infektion mit dem Wildtyp- bzw. Impfstamm nachweisen (Tab.4.2). Während IL-12 ab Tag 6 nach Infektion mit dem Impfstamm gebildet wurde, wurde nach Wildtypinfektion keine IL-12 Produktion beobachtet. Allerdings muß noch geklärt werden, ob es in der Baumwollratte zur Ausbildung einer Th2 Antwort kommt. Wenn ein IL-12 Mangel für die Ausbildung der Immunsuppression allein verantwortlich wäre, sollte bis zu Tag 6 auch nach Infektion mit dem Impfstamm eine Proliferationshemmung zu beobachten sein. Da das nicht der Fall ist, scheint es wahrscheinlicher, dass es sich bei der Masernvirus-induzierten Immunsuppression um eine vielschichtige Fehlregulation des Immunsystems handelt.

6. Zusammenfassung

Die Infektion mit MV Wildtypvirus führt zu einer starken Immunsuppression und Sekundärinfektionen, die bei der Immunisierung mit einem attenuierten Vakzinestamm nicht auftreten. *In vitro* Studien zeigen, dass sowohl MV Wildtyp- als auch Impfstamm-infizierte Zellen die Mitogen-induzierte Proliferation von humanen Blutlymphozyten inhibieren. Zur Bestätigung dieser Befunde im Baumwollrattenmodell wurde gezeigt, dass *in vitro* MV-infizierte Zellen die Proliferation der naiven Milzzellen hemmen und keine Unterschiede zwischen Wildtypen und Impfstämmen bestehen. Im Gegensatz dazu wurden nach intranasaler Infektion von Baumwollratten Unterschiede hinsichtlich der Proliferationsinhibition, Virusreplikation und Ausbreitung zwischen Wildtypvirus WTF und Impfstamm Edm gefunden. Nach intranasaler Infektion mit 10^5 TCID₅₀ WTF war am Tag 4 die Proliferation bis zu 40% inhibiert. Bis zu 20 Tagen nach Infektion mit WTF wurde eine Proliferationsinhibition gemessen und das Virus in den drainierenden Lymphknoten bis Tag 4 nachgewiesen. Desweiteren war eine Dosis von 10^3 TCID₅₀ WTF ausreichend, um die Proliferation der T-Zellen zu hemmen und Virus aus den drainierenden Lymphknoten zu isolieren. Dagegen führte die Infektion mit 10^5 TCID₅₀ Edm nicht zu einer Proliferationsinhibition und es wurde auch kein Virus in den drainierenden Lymphknoten nachgewiesen. Die intranasale Infektion mit Dosen von 10^3 TCID₅₀ WTF bzw. mit $2-4 \times 10^6$ TCID₅₀ Edm konnten im gleichem Maße die T-Zell-Proliferation hemmen. Somit war eine 1000fach niedrigere Dosis an WTF ausreichend, die gleiche hemmende Wirkung zu erzielen. Der gleiche Effekt wurde bei weiteren Wildtypstämmen (Bilthoven, ICB) und Impfstämmen gefunden.

Eine Ursache für den unterschiedlich immunsuppressiven Effekt zwischen Wildtypen und Impfstämmen könnte die unterschiedliche Rezeptornutzung sein. Wildtypviren benutzen CD150 als Rezeptor und Impfstämme sowohl CD150 als auch CD46. Die Impfstämme wurden ursprünglich von Edm Wildtyp durch Passagierung auf Fibroblasten-Zelllinien attenuiert und adaptierten an die CD46-Rezeptornutzung. Durch die dabei erfolgte Adaptation an CD46 wurde der Virus attenuiert. Dieses Phänomen konnte auch nach Passagierung eines Wildtypvirus auf verschiedenen Zelllinien gezeigt werden. Der auf lymphoiden Zellen passagierte Wildtyp WTFb und der auf

Fibroblasten-Zellen WTFv passagierte haben unterschiedliches immunsuppressives Potential. Interessanterweise zeigte Edm-Wildtyp nach 9 Passagen auf Fibroblasten-Zelllinien einen attenuierten Phänotyp im Baumwollrattenmodell. Allerdings revertierte dieser Virus bereits nach 3 Passagen in der Baumwollratte zu einem immunsuppressiven, sich ausbreitenden Virus. Die Untersuchung der rekombinanten Viren Edm (WTF H), Edm (WTF F) und Edm (WTF H+F) zeigte, dass Impfstämme, welche das Oberflächenprotein H von WTF anstelle des H-Proteins von Edm tragen, proliferationshemmend sind und sich im Organismus ausbreiten. Das F-Protein von Edm oder WTF hatte keinen Einfluß auf Immunsuppression und Virusausbreitung, Die Rückmutation in dem WTF H-Protein an der Aminosäure-Position 481 von Aspargin zu Tyrosin (N481Y) veränderte die Rezeptornutzung von CD46 auf CD150 und den Phänotyp von einem immunsuppressiven, sich ausbreitenden Virus zu einem nicht-immunsuppressiven, nicht-ausbreitenden Virus. Da die Aminosäureposition 481 einen starken Einfluß auf die Benutzung von CD46 oder CD150 ausübt, scheint somit das H-Protein von WTF die immunsuppressive Wirkung und Virusausbreitung maßgeblich zu beeinflussen.

Wie beim Menschen konnten in der Baumwollratte MV-infizierte Makrophagen nachgewiesen werden. Durch die Infektion mit einem GFP-MV wurde die Virusreplikation nachgewiesen, das Virus wurde aus Makrophagen rückisoliert und durch Kokultivierung mit Indikatorzellen die Ausprägung des zytopathischen Effektes fluoreszenzmikroskopisch beobachtet. Weitere Untersuchungen zeigten Unterschiede zwischen WTF und Edm-infizierten Makrophagen hinsichtlich der Proliferationsinhibition von Milzzellen. Der direkte Kontakt von Wildtyp WTF-infizierten Makrophagen hemmte die T-Zell-Proliferation. Dagegen wurde durch Edm-infizierte Makrophagen keine T-Zell-Proliferationinhibition ausgelöst. Erklären läßt sich das möglicherweise mit dem unterschiedlichen Sekretionsprofil verschiedener Interleukine von WTF und Edm-infizierten Makrophagen, da bei WTF-infizierten Makrophagen eine Unterdrückung der Produktion von IL-12 gefunden wurde.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass die im Menschen beobachteten Unterschiede hinsichtlich Virusausbreitung und Immunsuppression zwischen Wildtypen

und Impfstämmen mit den Befunden in der Baumwollratte übereinstimmen. Außerdem konnte festgestellt werden, dass die Interaktion von MV H-Protein und den Rezeptoren mit der Immunsuppression und Virusausbreitung korreliert. Die Unterdrückung der Sekretion von IL-12 in Makrophagen aus der Baumwollratte könnte die Hypothese unterstützen, dass die Immunsuppression während der MV-Infektion durch eine fehlgeleitete Th2-Antwort begünstigt wird.

6.1. Summary

Infection with MV wild type virus leads to a strong immune suppression and secondary infection, neither of which occurs as a result of immunization with an attenuated vaccine strain. *In vitro* studies show that wild type MV as well as vaccine strain infected cells inhibit the mitogen-induced proliferation of human blood lymphocytes. As confirmation of these results, it has been shown that *in vitro* MV-infected cotton rat cells cause a decrease in proliferation of naive spleen cells with no difference between the wild type and vaccine strain. Differences in proliferation inhibition, virus replication, and viral spread were, however, found after intranasal infection of cotton rats using either wild type virus (WTF) or vaccine strain (Edm). Intranasal infection with 10^5 TCID₅₀ WTF leads to proliferation inhibition of up to 40% on day 4 p.i.. Proliferation inhibition was observed up to 20 days after infection with WTF and virus has been isolated up to day 4 in the draining lymph nodes. Furthermore, a dose of 10^3 TCID₅₀ WTF was sufficient to inhibit the proliferation of T-cells, and to allow for the isolation of virus from the draining lymph nodes. In comparison infection with 10^5 TCID₅₀ Edm did not cause any proliferation inhibition and no virus could be detected in draining lymph nodes. It was found that intranasal infection with 10^3 TCID₅₀ WTF and $2-4 \times 10^6$ TCID₅₀ Edm restricted T-cell growth to a similar extent. Thus a 1000-fold lower dose of WTF was sufficient to attain an equivalent restriction of T-cell proliferation. This effect was also found for other wild-type (Bilthoven, ICB) and vaccine strains. The differential immunosuppressive effect between wild type and vaccine strains may be caused by differences in receptors used by these viruses. Wild-type viruses use CD150 as a receptor while vaccine strains can use either CD150 or CD46. The vaccine strains were originally attenuated by passaging on fibroblast-cell lines and adapted to use CD46. The virus was attenuated through adaptation to CD46. This phenomenon was shown after passaging a wild-type virus on different cell lines. WTF-b, passaged on lymphoid cell lines, and WTF-v, passaged on fibroblast cells vary in their immunosuppressive potential. Interestingly, Edm-wild type showed an attenuated phenotype in the cotton rat model after 9 passages on fibroblast cell lines. However, this virus reverted after 3 passages to a immunosuppressive, disseminating virus. Investigation of the recombinant viruses Edm (WTF H), Edm (WTF F) and Edm (WTF

H+F) showed that the vaccine strains which carry the surface protein H from WTF instead of that of Edm restrict proliferation and disseminate in the infected organism. The F-protein, whether from Edm or WTF, did not have an influence on the immune suppression and virus dissemination. The reverse mutation of the WTF H-protein at the amino acid position 481 from asparagine to tyrosine (N481Y) changes receptor use from CD46 to CD150 and the phenotype from immunosuppressive, disseminating to non-immunosuppressive, non-disseminating virus. Because the amino acid position influences the use of CD46 or CD150 strongly, the H protein from WTF appears to have considerable influence on the immunosuppressive effect and virus dissemination.

As in MV infected humans, infected macrophages were detected in the cotton rat. Virus replication was demonstrated through infection with a MV expressing green fluorescent protein, the virus was reisolated from macrophages, and the development of the cytopathic effect in co-cultivated indicator cells was observed using light microscopy. Further investigations showed differences between WTF and Edm infected macrophages in respect to the proliferation inhibition of spleen cells. The direct contact of wild type WTF-infected macrophages restricted T-cell proliferation. On the other hand, no T-cell proliferation inhibition was caused by Edm infected macrophages. This can possibly be explained by the differences in secretion profiles by macrophages infected with WTF or Edm of various interleukins, as a suppression of IL-12 production was found in WTF infected macrophages.

In the presented work, it was shown that the differences between wild-type and vaccine strain viruses in the context of virus dissemination and immune suppression as noted in humans were in agreement with findings in the cotton rat. In addition, it was determined that the interaction of the H-protein with its receptors correlated with immunosuppression and virus dissemination. The suppression of IL-12 secretion by macrophages isolated from cotton rats supports the hypothesis that the immune suppression during MV infection is favoured by a misdirected Th2 response.

7. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Abs.	Abschnitt
APZ	Antigenpräsentierende Zelle
ATV	geeicht Trypsin Versene
B/Akt	Kinase
BALT	bronchienassoziierte lymphatische Gewebe
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
bzw.	beziehungsweise
B RNS	Histon RNS
ca.	circa
C	C Protein des MV
°C	Grad Celsius
cDNA	Komplementäre DNS
CD	Cluster Of Differentiation (Oberflächenantigen)
CDV	Canine Distemper Virus (Staupe-Virus)
Ci	Curie
CO ₂	Kohlendioxid
Con A	Concavalin A
cm ²	Quadratcentimeter
CPE	Zytopathischer Effekt
cpm	counts per minute (Zerfälle pro Minute)
CR	Cotton Rat (Baumwollratte)
DC	Dendritische Zellen
dest.	destilliert
DMEM	Dulbecco`s MEM
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
dNTP`s	Desoxynukleotidtriphosphate
DTT	Dithiothreitol
EBV	Ebstein-Barr-Virus
Edm	MV-Stamm Edmonston
Edm-NSE	Molekularer Klon von Edm
EDTA	Ethylendiamintriacetat
ELISA	Enzym Linked Immunosorbent Assay (Enzym-gekoppelter Immunadsorptionsversuch)
FA	Formaldehyd
FACS	Fluorescein Activated Cell Scanner (Durchflußzytometer)
F-Protein	Fusionsprotein des Masernvirus
FITC	Fluoreszeinisothiocyanat
FKS	Fetales Kälber Serum
G _{0,1,2}	Zellzyklusphase
GAPDH	Glutaraldehydphosphatdehydrogenase
GFP	Grün-fluoreszierendes Protein
GRO	Wachstumregulierendes Protein
h	Stunden

HAT	Hypoxanthin Aminopterin Thymidin
HIV	Menschliches Immunschwächevirus
H-Protein	Hämagglutininprotein des Masernvirus
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
IE	Internationale Einheiten
i.n.	intranasal
I.P.10	Interferon gamma induziertes Protein 10 Vorläufer
IU	International Units
J	Joul
kDa	Kilodalton
l	Liter
log	Logarithmus
L-Protein	Large-Protein des Masernvirus (Polymerase des MV)
LPS	Lipopolysaccharid
μ	Mikro-
μg	Mikrogramm
μl	Mikroliter
m	Milli-
M	Molar
MCP	membranständiges Kofaktorprotein (CD46)
MEM	Minimal Essential Medium
MHC	Major Histocompatibility Complex (Haupthistokompatibilitätskomplex)
M.O.I.	Multiplicity Of Infection
min	Minute
MIP	Makrophagen inhibitorisches Protein
M-Protein	Matrixprotein des Masernvirus
mRNS	messenger-RNS (Boten-RNS)
MV	Masernvirus
n.b.	nicht bestimmt
nm	Nanometer
N	Asparagin
N-Protein	Nukleokapsidprotein des Masernvirus
p35	leichte Kette
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphate Buffered Saline (Phosphat-gepufferte Salzlösung)
PCR	Polymerase Kettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PFU	Plaque Forming Units (Plaque bildende Einheiten)
pH-Wert	negativer dekadischer Logarithmus der Hydroniumionen-Konzentration
p.i.	nach infektion
PNPP	P-Nitrophenylphosphat
P-Protein	Phosphoprotein des Masernvirus
RANTES	Rantes chemokine
RNS	Ribonukleinsäure
RPMI 1640	Rosvell-Park-Memorial-Institute, Medium 1640

rpm	„rounds per minute“, Umdrehungen pro Minute
RPV	Rinderpest Virus
RSV	Respiratorisches Synzytial Virus
RT	Raumtemperatur
S	Zellzyklusphase
SCID	severs combined immunodeficiency: schwere kombinierte Immundefizienz
SCR	Kurze Wiederholungssequenzen
Sek	Sekunde
STP	Serin-Prolin-Threonin-reiche Domäne
SLAM	Signalling Lymphocyte Activation Molecule (CD150)
SSPE	Subakute sklerosierende Panenzephalitis
Tab.	Tabelle
TCID ₅₀	Tissue Culture Infectious Dose 50 %
TH	T-Helfer-Zelle
TNF	Tumornekrosefaktor
UV	Ultraviolett
VSV	Vesikuläres Stomatitis Virus
WHO	Weltgesundheitsorganisation
WT	Wildtyp
WTF	Wildtyp Fleckenstein
Y	Tyrosin
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Verzeichnis der Abbildungen, Bilder und Tabellen

Abbildungen:

Abb. 1.1.: Schematische Struktur eines Masernvirus-Partikels	14
Abb. 1.2.: Struktur der Masernvirus-Rezeptoren CD46 und CD150	16
Abb. 2.1.: Überblick über die Genomstruktur der eingesetzten rekombinanten Masernviren basieren auf dem Vakzinestamm Edmonston-B.	31,32
Abb. 3.1.: Schematische Darstellung von Proliferationstest der Milzzellen	38
Abb. 3.2.: Schematische Darstellung von Proliferationstest mit CR-T2- Zellen	39
Abb. 3.3.: Schematische Darstellung von Proliferationstest mit in vivo infizierten Makrophagen	40
Abb. 4.1.: Verlauf der Proliferationsinhibition von Baumwollratten- Milzzellen nach Kontakt mit WTF und Edm infizierten CR-T2	52
Abb. 4.2.: Unterschiede in der Kinetik der Mitogen-stimulierten Proliferation nach Infektion mit WTF und Edm.	53
Abb. 4.3.: Unterschiede in Kinetik der Mitogen-stimulierten Proliferation nach Infektion mit 10^5 TCID ₅₀ WTF und $2-4 \times 10^6$ TCID ₅₀ Edm.	54
Abb. 4.4.: Bestimmung der Viruslast in Lunge und in den drainierenden Lymphknoten nach Tag 4 p.i.	56
Abb. 4.5.: Dosis-abhängige Korrelation nach WTF-Infektion zwischen Proliferationsinhibition und Virusreplikation in den drainierenden Lymphknoten.	57
Abb. 4.6.: Vergleich der Proliferationsinhibition und Virusreplikation in den drainierenden Lymphknoten zwischen MV Wildtypen und Impfstämmen.	59
Abb. 4.7.: Vergleich zwischen unterschiedlich passagierten Wildtyp- und Impfstämmen.	61

Abb. 4.8. : Einfluß der F- und H-Proteine von rekombinanten Viren auf Immunsuppression und Ausbreitung.	63
Abb. 4.9.: Einfluß der Punktmutation N481Y im H-Protein von WTF.	64
Abb. 4.10.: Morphologie von Lungen-Lavage-Zellen nach der Infektion i.n. 10^5 TCID ₅₀ Edm(WTF H+F)	66
Abb. 4.11.: FACS-Analyse zur Charakterisierung der Lungenlavage-Makrophagen.	67
Abb. 4.12.: FACS-Analyse zum Nachweis der viralen Proteinexpression	69
Abb. 4.13.: Bestimmung des Virustiters von infizierten Makrophagen	71
Abb. 4.14.: Verlauf der Proliferationsinhibition von Milzzellen nach Kontakt mit WTF und Edm-infizierten Makrophagen	74

Bilder:

Bild 1.1.: <i>Sigmodon hispidus</i>	22
Bild 4.1.: Dichter Zellrasen von Lungenlavage-Makrophagen	65
Bild 4.2.: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von infizierten Makrophagen	70
Bild 4.3.: Synzythienbildung in Zellkultur	72

Tabellen:

Tab. 1.1.: Taxonomie wichtiger Vertreter der Familie <i>Paramyxoviridae</i>	12
Tab. 2.1.: Zelllinien	29
Tab. 2.2.: Virusstämme	30
Tab. 2.3.: Antikörper	33
Tab. 2.4.: PCR-Primer.	34
Tab. 4.1.: Kinetik der Synzythienbildung nach der Infektion mit WTF und Edm	73
Tab. 4.2.: Zytokin-Sekretion von infizierten Makrophagen	76

9 Literaturverzeichnis

ABRAMOWITZ, A., Tamir, I., Livni, N., Lotan, C. and Morag, A. (1984) Polymorphonuclear leukocyte-associated antigenemia in measles: demonstration and significance. *J. Virol.*: 13, 293-299.

ALKHATIB, G., and D. J. Briedis. (1986). The predicted primary structure of the measles virus hemagglutinin. *Virology.*: 150,479-490.

ARNEBORN, P, Biberfeld G.(1983) T-lymphocyte subpopulations in relation to immunosuppression in measles and varicella. *Infect Immun.*: 39,29-37.

ATABANI, S.F, Byrnes AA, Jaye A, Kidd IM, Magnusen AF, Whittle H, Karp CL. (2001) Natural measles causes prolonged suppression of interleukin-12 production. *J Infect Dis*.:184, 1-9.

AUWAERTER, P. G., Kaneshima, H., McCune, J. M., Wiegand, G. and Griffin, D. E. (1996) Measles virus infection of thymic epithelium in the SCID-hu mouse leads to thymocyte apoptosis. *J. Virol.*: 70, 3734-3740.

AUWAERTER, P. G., Rota, P. A., Elkins, W. R., Adams, R. J., DeLozier, T., Shi, Y., Bellini, W. J., Murphy, B. R. and Griffin, D. E. (1999) Measles virus infection in Rhesus macaques: altered immune responses and comparison of the virulence of six different virus strains. *J. Infect. Dis.*: 180, 950-958.

AVOTA, E., A. Avots, S. Niewiesk, L. P. Kane, U. Bommhardt, and V ter Meulen. (2001). Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus. *Nature Medicine.*: 6,725-731.

BANKAMP, B, Bellini WJ, Rota PA. (1999) Comparison of L proteins of vaccine and wild-type measles viruses. *J Gen Virol.*: 80, 1617-25.

BARTZ, R., Firsching, R., Rima, B., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (1998) Differential receptor usage by measles virus strains. *J. Gen. Virol.*: 79, 1015-1025.

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*.:224, 334-7.

BLACK, J. B., Durigon, E., Kite-Powell, K., de Souza, L., Curli, S. P., Afonso, A. M. and Theobaldo, M. (1996) Seroconversion to human herpesvirus 6 and human herpesvirus 7 among brazilian children with clinical diagnoses of measles or rubella. *Clin. Infect. Dis.*: 23, 1156-1158.

BLIXENKRONE-MÖLLER, M., Bernard, A., Bencsik, A., Sixt, N., Diamond, L. E., Logan, J. S. and Wild, T. F. (1998) Role of CD46 in measles virus infection in CD46 transgenic mice. *Virology*.: 249, 238-248.

BORROW, P. and Oldstone, M. B. A. (1995) Measles virus- mononuclear cell interactions. In: *Measles Virus*, M. Billeter and V. ter Meulen, Springer, Berlin, 85-100.

BURNSTEIN, T., Jensen, J. H. and Waksman, B. H. (1963) The development of a neurotropic strain of measles virus in hamsters and mice. *J. Infect. Dis.*: 113, 265-272.

BYRD, L. G. and Prince, G. A. (1997) Animal models of respiratory syncytial virus infection. *Clin. Infect. Dis.*: 25, 1363-1368.

CHRISTENSON, B, Bottiger M. (1994) Measles antibody: comparison of long-term vaccination titres, early vaccination titres and naturally acquired immunity to and booster effects on the measles virus. *Vaccine*.: 12, 129-33.

CLEMENTS, C.J. u. F.T. Cutts (1995) The Epidemiology of Measles; Thirty Years of Vaccination. in: V. ter Meulen u. M. Billeter (Hrsg): *Measles Virus, Current topics in Microbiology and Immunology* 191 Verlag Springer, Berlin Heidelberg, S. 13-33

DAMIEN, B, Huiss S, Schneider F, Muller CP. (1998) Estimated susceptibility to asymptomatic secondary immune response against measles in late convalescent. *J Med Virol.*: 56, 85-90.

DOERIG, R. E., A. Marcil, A. Chopra, and C. D. Richardson. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell.*: 75,295-305.

DUPREX, W. P, McQuaid S, Roscic-Mrkic B, Cattaneo R, McCallister C, Rima BK.(2000) In vitro and in vivo infection of neural cells by a recombinant measles virus expressing enhanced green fluorescent protein. *J Virol.*: 74,7972-9.

ENGELKING, O, Fedorov LM, Lilischkis R, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. (1999) Measles virus-induced immunosuppression in vitro is associated with deregulation of G1 cell cycle control. *J Gen Virol.*: 80, 1599-608.

EPIDEMIOLOGISCHES BULLETIN 44/99

ERLENHOEFER, C., W. P. Duprex, B. K. Rima, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. (2002). Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J. Gen. Virol.*: 83,1431-1436.

ERLENHOEFER, C., W. J. Wurzer, S. Loffler, S. Schneider-Schaulies, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies. (2001). CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J. Virol.*: 10,4499-4505.

ESOLEN, L. M., Ward, B. J., Moench, T. R. and Griffin, D. E. (1993) Infection of monocytes during measles. *J. Infect. Dis.*: 168, 47-52.

FAITH, R. E., Montgomery, C. A., Durfee, W. J., Aguilar-Cordovy, E. and Wyde, P. R. (1997) The cotton rat in biomedical research. *Lab. Animal Science*: 47, 337-345.

FIREMAN, P., Friday, G. and Kumate, J. (1969) Effect of measles vaccine on immunologic responsiveness. *Pediatrics.*: 43, 264-272.

FUGIER-VIVIER, I., Servet-Delphrat, C., Rivallier, P., Rissoan, M. C., Liu, Y. J. and Roubourdin-Combe, C. (1997) Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells. *J. Exp. Med.*: 186, 813-823.

GRIFFIN, D. E., Mullinx, J., Narayan, O. and Johnson, R. T. (1974) Age dependence of viral expression: comparative pathogenesis of two rodent-adapted strains of measles virus in mice. *Infect. Immun.*: 9, 690-695.

GRIFFIN, D. E. and Ward, J. B. (1993) Differential CD4 T cell activation in measles. *J. Infect. Dis.*: 168, 275-281.

GRIFFIN, D. E., Ward, B. J. and Esolen, L. M. (1994) Pathogenesis of measles virus infection: an hypothesis for altered immune responses. *J. Infect. Dis.*: 170 Suppl. 1, 24-31.

GRIFFIN, D. E. (1995) Immune responses during measles virus infection. In: *Measles virus*, M. Billeter and V. ter Meulen, Springer, Berlin, 117-134.

GROSJEAN, I, Caux C, Bella C, Berger I, Wild F, Banchereau J, Kaiserlian D. (1997) Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells. *J Exp Med.*: 15;186, 801-12.

HASHIMOTO, K., Ono, N., Tatsuo, H., Minagawa, H., Takeda, M., Takeuchi, K., Yanagi, Y. (2002) SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J. Virol.*:76, 6743-6749

HELIN, E, Salmi AA, Vanharanta R, Vainionpaa.(1999) Measles virus replication in cells of myelomonocytic lineage is dependent on cellular differentiation stage. *Virology.*: 253,35-42.

HORVAT, B., Rivaller, P., Varior-Krishnan, G., Cardoso, A., Gerlier, D. and Roubadin-Combe, C. (1996) Transgenic mice expressing human measles virus (MV) receptor CD46 provide cells exhibiting different permissivities to MV infection. *J. Virol.*: 70, 6673-6681.

HSU, E. C., C. Iorio, F. Sarangi, A. A. Khine, and C. D. Richardson. (2001). CDw150(SLAM) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus. *Virology.*: 279,9-21.

IHARA, T, Yasuda N, Kitamura K, Ochiai H, Kamiya H, Sakurai M. (1992) Prolonged viremic phase in children with measles. *J Infect Dis.*: 166, 941.

ILONEN, J, Salonen R, Marusyk R, Salmi A. (1988) Measles virus strain-dependent variation in outcome of infection of human blood mononuclear cells. *J Gen Virol.*: 69, 247-52.

JOHNSTON, I. C. D., ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. and Schneider-Schaulies, S. (1999) A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism. *J. Virol.*: 73, 6903-6915.

KARP, C. L., Wysocka, M., Wahl, L. M., Ahearn, J. M., Cuomo, P. J., Sherry, B., Trinchieri, G. and Griffin, D. E. (1996) Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus. *Science.*: 273, 228-231.

KATZ, M. (1995) Clinical spectrum of measles. In: *Measles virus*, M. Billeter and V. ter Meulen, Springer, Berlin, 1-12.

KLAGGE, I.M, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. (2000) Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface. *Eur J Immunol.*:30, 2741-50.

KOBUNE, F., Takahashi, H., Terao, K., Ohkawa, T., Ami, Y., Suzaki, Y., Nagata, N., Sakata, H., Yamanouchi, K. and Kai, C. (1996) Nonhuman primate models of measles. *Lab. Animal Sci.*: 46, 315-320.

KOPLIK, H. (1896) The diagnosis of the invasion of measles from a study of exanthema as it appears on the buccal mucous membrane. *Arch. Pediatr.* 12, 918-920

LAMB, R.A. (1993) Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *Virology.*: 197, 1-11

LEOPARDI, R, Vainionpaa R, Hurme M, Siljander P, Salmi AA. (1992) Measles virus infection enhances IL-1 beta but reduces tumor necrosis factor-alpha expression in human. *J Immunol.*: 149, 2397-401.

LEOPARDI, R, Ilonen J, Mattila L, Salmi AA.(1993) Effect of measles virus infection on MHC class II expression and antigen presentation in human. *Cell Immunol.*: 147,388-96.

LI, H, Hickman CJ, Helfand RF, Keyserling H, Anderson LJ, Bellini WJ. (2001) Induction of cytokine mRNA in peripheral blood mononuclear cells of infants after the first dose of measles vaccine. *Vaccine.*: 19, 4896-900.

LIEBERT, U. G. u. ter Meulen, V. (1987) Virological aspects of measles virus-induced encephalomyelitis in Lewis and BN rats. *J. Gen. Virol.*: 68, 1715-1722.

MCCHESENEY, M. B., Kehrl, J. H., Valsamakis, A., Fauci, A. S. and Oldstone, M. B. A. (1987) Measles virus infection of B lymphocytes permits cellular activation but blocks progression through the cell cycle. *J. Virol.*: 61, 3441-3447.

MCCHESENEY, M. B., Altmann, A. and Oldstone, M. B. A. (1988) Suppression of T lymphocyte function by measles virus is due to cell cycle arrest in G1. *J. Virol.*: 140, 1269-1273.

MOENCH, T.R, 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.*: 158, 433-42.

MRKIC, B., Pavlovic, J., Rulicke, T., Volpe, P., Buchholz, C. J., Hourcade, D., Atkinson, J. P., Aguzzi, A. and Cattaneo, R. (1998) Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice. *J. Virol.*: 72, 7420-7427.

NAKAYAMA, T., Mori, T., Yamaguchi, S., Sonoda, S., Asamura, S., Yamashita, R., Takeuchi, Y. and Urano, T. (1995) Detection of measles virus genome directly from clinical samples by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and genetic variability. *Virus Research.*: 35, 1-16.

NANICHE, D., G. Varior-Krishnan, G. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Rabourdin-Combe, and D. Gerlier. (1993). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as cellular receptor for measles virus. *J. Virol.*: 67,6025-6032.

NANICHE, D, Reed SI, Oldstone MB. (1999) Cell cycle arrest during measles virus infection: a G0-like block leads to suppression of retinoblastoma protein expression.. *J Virol.*: 73, 1894-901.

NIELSEN, L., M. Blixenkrone-Moller, M. Thylstrup, N. J. Hansen, and G. Bolt. (2001). Adaptation of wild-type measles virus to CD46 receptor usage. *Arch. Virol.*: 146,197-208.

NIEWIESK, S., Schneider-Schaulies, J., Ohnimum, H., Jassoy, C., Schneider-Schaulies, S., Diamond, L., Logan, J. S. and ter Meulen, V. (1997) CD46 expression does not overcome the intracellular block of measles virus replication in transgenic rats. *J. Virol.*: 71, 7969-7973.

NIEWIESK, S., Völp, F., and Volker ter Meulen (1997). A maintenance and handling device for cotton rats (*Sigmodon hispidus*). *Lab Animal.*: 26, 32-33.

NIEWIESK, S., I. Eisenhuth, A. Fooks, J. C. S. Clegg, J.-J. Schnorr, S. Schneider-Schaulies, and V. ter Meulen. (1997). Measles virus-induced immune suppression in the cotton rat (*Sigmodon hispidus*) model depends on viral glycoproteins. *J. Virol.*: 71,7214-7219.

NIEWIESK, S, Gotzelmann M, ter Meulen V (2000) Selective in vivo suppression of T lymphocyte responses in experimental measles virus infection. *Proc Natl Acad Sci U S A.*: 97, 4251-5.

.
NUSSBAUM, O., C.C. Broder, B. Moss, L.B. Stern, S. Rozenblatt u. E.A. Berger (1995) Functional and structural interactions between measles virus haemagglutinin and CD46. *J. Virol.*: 69, 3341-3349

OHGIMOTO, S, Ohgimoto K, Niewiesk S, Klagge IM, Pfeuffer J, Johnston IC, Schneider-Schaulies J, Weidmann A, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. (2001) The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro. *J Gen Virol.*: 82, 1835-44

OKADA, H, Sato TA, Katayama A, Higuchi K, Shichijo K, Tsuchiya T, Takayama N, Takeuchi Y, Abe T, Okabe N, Tashiro M. (2001) Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Arch Virol.*: 146, 859-74.

OLDSTONE, M. B. A., Lewicki, H., Thomas, D., Tishon, A., Dales, S., Patterson, J., Manchester, M., Homann, D., Nanche, D. and Holz, D. (1999) Measles virus infection in a transgenic model: virus-induced immunosuppression and central nervous system disease. *Cell.*: 98, 629-640.

ONO, N., H. Tatsuo, Y. Hidaka, T. Aoki, H. Minagawa, and Y. Yanagi. (2001). Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. *J. Virol.*: 75,4399-4401.

PIRQUET, v., C. (1908) Das Verhalten der kutanen Tuberkulin-Reaktion während der Masern. *Dt. Med. Wochenschr.*: 34, 1297-1300.

POLACK, F. P., Auwaerter, P. G., Lee, S.-H., Nousari, H. C., Valsamakis, A., Leiferman, K. M., Diwan, A., Adams, R. J. and Griffin, D. E. (1999) Production of atypical measles in rhesus macaques: evidence for disease mediated by immune complex formation and eosinophils in the presence of fusion-inhibiting antibody. *Nat. Med.*: 5, 629-634.

POLACK, F.P, Lee SH, Permar S, Manyara E, Nousari HG, Jeng Y, Mustafa F, Valsamakis A, Adams RJ, Robinson HL, Griffin DE. (2000) Successful DNA immunization against measles: neutralizing antibody against either the hemagglutinin or fusion glycoprotein protects rhesus macaques without evidence of atypical measles. *Nat Med.*:6, 776-81.

POLACK, F. P, Hoffman SJ, Moss WJ, Griffin DE.(2002) Altered synthesis of interleukin-12 and type 1 and type 2 cytokines in rhesus macaques during measles and atypical measles. *J Infect Dis.*: 185,13-9.

RALL, G. F., Manchester, M., Daniels, L. R., Callahan, E. M., Belman, A. R. and Oldstone, M. B. (1997) A transgenic mouse model for measles virus infection of the brain. *Proc. Natl. Acad. Sci.*: 94, 4659-4663.

REED, L.J. u. H. Muench (1938) A simple Method of estimating fifty per cent endpoints. *Am. J. Hygiene.*: 27, 493-497

RICHARDSON, C., D. Hull, P. Greer, K. Hasel, A. Berkovich, G. Englund, W. Bellini, B. Rima u. r. Lazzarini (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.*: 155, 508-523

RIEDL, R., Moll, M., Klenk, H. D., Meisner, A. (2002) Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. *Virus Res.*: 26, 83(1-2):1-12

RILEY, E. C., G. Murphy u. R.L. Riley (1978) Airborne spread of measles in a suburban elementary school. *Am. J. Epidemiol.*: 107, 421-432

RIMA, B., J. Earle, K. Bacsko, V. ter Meulen, U. Liebert, C. Carstens, J. Carabana, M. Caballero, M. Celma, and R. Fernandez-Munoz. (1997). Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J. Gen. Virol.*: 78,97-106.

ROTA, J. S., K. B. Hummel, P. A. Rota, and W. J. Bellini. (1992). Genetic variability of the glycoprotein genes of current wild-type measles isolates. *Virology.*: 188,135-142.

ROTA, J. S, Wang ZD, Rota PA, Bellini WJ.(1994) Comparison of sequences of the H, F, and N coding genes of measles virus vaccine strains. *Virus Res.*: 31,317-30.

ROTA, P.A, Khan AS, Durigon E, Yuran T, Villamarzo YS, Bellini WJ. (1995) Detection of measles virus RNA in urine specimens from vaccine recipients. *J Clin Microbiol.*:33, 2485-8.

SALONEN, R., Ilonen J, Salmi A.(1988) Measles virus infection of unstimulated blood mononuclear cells in vitro: antigen expression and virus. *Clin Exp Immunol.*: 71,224-8.

SANCHEZ-LANIER, M., Guerlin, P., McLaren, L. C. and Bankhurst, A. D. (1988) Measles-induced suppression of lymphocyte proliferation. *Cell. Immunol.*: 116, 367-381.

SCHLENDER, J., Schnorr, J. J., Cattomen, T., Cattaneo, R., Billeter, M. A., Ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. (1996) Surface interaction of measles virus glycoproteins is necessary and sufficient for the induction of proliferative inhibition of human peripheral blood mononuclear cells. *Proc. Natl. Acad. Sci.*: 93, 13194-13199.

SCHNEIDER-SCHAULIES, J., L. M. Dunster, F. Kobune, B. Rima, and V. ter Meulen. (1995). Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J. Virol.*: 69,7257-7259.

SCHNEIDER-SCHAULIES, J., J.-J. Schnorr, U. Brinckmann, L. M. Dunster, K. Baczko, U. G. Liebert, S. Schneider-Schaulies, and V. ter Meulen. (1995). Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild type and vaccine strain. *Proc. Nat. Acad. Sci.*: 92.3943-3947.

SCHNORR, J.-J., Seufert, M., Schlender, J., Borst, J., Johnson, I. C. D., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. (1997) Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression in vitro. *J. Gen. Virol.*: 78, 3217-3226.

SCHNORR, J. J., Xanthakos, S., Keikavoussi, P., Kampgen, E., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, S. (1997) Induction of maturation of human blood cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression. *Proc. Natl. Acad. Science*: 94, 5326-5331.

SHIBAHARA, K., H. Hotta, Y. Katayama, and M. Homma. (1994) Increased binding activity of measles virus to monkey red blood cells after long-term passage in Vero cell cultures. *J. Gen. Virol.*: 75,3511-3516.

SINGH, M, Cattaneo R, Billeter MA.(1999) A recombinant measles virus expressing hepatitis B virus surface antigen induces humoral immune responses in genetically modified mice. *J Virol.*: 73,4823-8.

TAKEUCHI, K, Miyajima N, Kobune F, Tashiro M (2000) Comparative nucleotide sequence analyses of the entire genomes of B95a cell-isolated and vero cell-isolated measles viruses from the same patient. *Virus Genes.*:20, 253-7.

TAMASHIRO, V. G., Perez, H. H. and Griffin, D. E. (1987) Prospective study of the magnitude and duration of changes in tuberculin reactivity during complicated and uncomplicated measles. *Pediatr. Infect. Dis.*: 6, 451-454.

TATSUO, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi. (2000) SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature.*: 406,893-897.

TISHON, A., Manchester, M., Scheiflinger, F. and Oldstone, M. B. A. (1996) A model of measles virus-induced immunosuppression: enhanced susceptibility of neonatal human peripheral blood lymphocytes. *Nature Med.*: 2, 1250-1254.

TOBER, C, Seufert M, Schneider H, Billeter MA, Johnston IC, Niewiesk S, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S. (1998) Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *J Virol.*:72, 8124-32.

VAN BINNENDIJK, R. S., van der Heijden, R. W., van Amerongen, G., Uytdehaag, F. G. and Osterhaus, A. D. (1994) Viral replication and development of specific immunity in macaques after infection with different measles virus strains. *J. Infect. Dis.*: 170, 443-448.

VAN BINNENDIJK, R. S., van der Heijden, R. W. J. and Osterhaus, A. D. M. E. (1995) Monkeys in measles research. In: Measles Virus, M. A. Billeter and V. ter Meulen, Springer, Berlin, 135-148.

VAN BINNENDIJK, RS, Poelen MC, van Amerongen G, de Vries P, Osterhaus AD. (1997) Protective immunity in macaques vaccinated with live attenuated, recombinant, and subunit measles vaccines in the presence of passively acquired antibodies. *J Infect Dis.*:175, 524-32.

VARSANYI, T.M., H. Jörnvall u. E. Norrby (1985) Isolation and characterization of the Measles virus F₁ polypeptide: comparison with other paramyxovirus fusion proteins. *Virology.*: 147, 110-117

WEIDMANN, A, Fischer C, Ohgimoto S, Ruth C, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S.(2000) Measles virus-induced immunosuppression in vitro is independent of complex glycosylation of viral glycoproteins and of hemifusion. *J Virol.*: 74, 7548-53.

WORLD HEALTH REPORT 1997

WYDE, P. R., Ambrosi, M. W., Voss, T. G., Meyer, H. L. and Gilbert, B. F. (1992) Measles virus replication in lungs of hispid cotton rats after intranasal inoculation. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*: 201, 80-87.

WYDE, P. R., D. K. Moore-Poveda, N. J. Daley, and H. Oshitani. (1999). Replication of clinical measles virus strains in hispid cotton rats. *Proc. Soc. Exp. Biol. Med.*: 221,53-62

YANAGI, Y., Cubitt, B. and Oldstone, M. B. A. (1992) Measles virus inhibits mitogen-induced T cell proliferation but does not directly perturb the T cell activation process inside the cell. *Virology.*: 187, 280-289.

YETGIN, S. and Altay, C. (1980) Defective bactericidal function of polymorphnuclear neutrophils in children with measles. *Acta Paediatr. Scand.*: 69, 411-413.

ZHANG, X, Glendening C, Linke H, Parks CL, Brooks C, Udem SA, Oglesbee M (2002) Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J Virol.*: 76, 8737-46.

ZHU, Y., Fennelly, G., Miller, C., Tarara, R., Saxe, I., Bloom, B. and McChesney, M. (1997) Recombinant Bacille Calmette-Gue´rin expressing the measles virus nucleoprotein protects infant Rhesus macaques from measles virus pneumonia. *J. Inf. Dis.*: 176, 1445-1453.

10. Veröffentlichungen

Publikationen:

PFEUFFER.J., K.PÜSCHEL, V. TER MEULEN, J.SCHNEIDER-SCHAULIES, S.NIEWIESK. (2003)

Extent of measles virus spread and immune suppression differentiates between wildtype and vaccine strains in cotton rat model (*Sigmodon hispidus*)

J. Virol. 2003 Jan;77(1):150-8.

OGHIMOTO.S., K.OGHIMOTO, S.NIEWIESK, I.KLAGGE, **J.PFEUFFER**, I.C.D.JOHNSTON, J.SCHNEIDER-SCHAULIES, A. WEIDMANN, V. TER MEULEN, S.SCHNEIDER-SCHAULIES. (2001)

The hemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells *in vitro*

J. Gen. Virol. 2001 Aug;82(Pt 8):1835-44.

Vorträge:

X. Measles Virus Meeting, Flein 26-28.10.2000

J.PFEUFFER

Differences in immune suppression and dissemination between measles virus vaccine and wildtype strains

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Dresden 14-17.03.2001

J.PFEUFFER, J.SCHNEIDER-SCHAULIES, V. TER MEULEN, S.NIEWIESK.

Unterschiede in Immunsuppression und Virusausbreitung zwischen Masernvirus Vakzine- und Wildtypstämmen im Baumwollrattenmodell

XI. Measles Virus Meeting, Flein 18-20.10.2001

J.PFEUFFER

Evaluation of the pathogenic potential of wild type versus vaccine measles virus strains in the cotton rat model

Posterpräsentation:

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen 8-11.04.2002

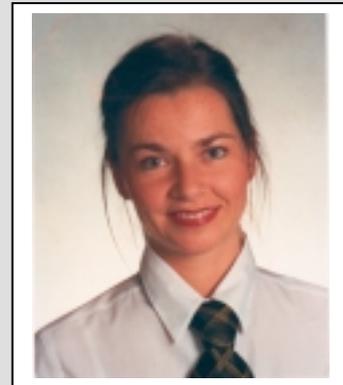
J.PFEUFFER, J.SCHNEIDER-SCHAULIES, V. TER MEULEN, S.NIEWIESK.

Differences in measles virus spread and immune suppression between wild type and vaccine strains in the cotton rat model (*Sigmodon hispidus*)

LEBENS LAUF

Joanna Pfeuffer
geboren am 01.05.1967
in Swidnica/Poland
veheiratet

Ausbildungshintergrund:
Zootechnik



Berufliche Ausbildung

- Seit 10/1999 Wissenschaftliche Mitarbeiterin im Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-Universität in Würzburg, Institutsvorstand: Prof. V. ter Meulen
Anfertigung einer Dissertation mit dem Thema: Untersuchung der Masernvirus-induzierten Immunsuppression im Baumwollrattenmodell
- 05.1992-09.1992 Diplomandin an der Fakultät für Zoohygiene der Landwirtschaftsakademie-Akademia Rolnicza in Breslau (Wroclaw), Fakultätsvorstand: Prof. Z. Dobrzanski
Anfertigung einer Diplomarbeit mit dem Thema: Statistische Untersuchung der Qualität von Grundwasser und deren Einfluß auf Nutztiere in landwirtschaftlichen Betrieben
- 10.1986-04.1992 Hauptstudium der Zootechnik, Studiengang Diplom
Hauptfach: Zoohygiene
Abschluß: Diplom-Zootechnik (Mgr.inz. Zootechnik)

Schul Ausbildung

- 1982-1986 I Liceum Ogólnokształcące im Jana Kasprowicza w Swidnicy (Gymnasium, abgeschlossen mit Abitur)
- 1974-1982 Grundschule Swidnica

Würzburg,

(Joanna Pfeuffer)