

Identifizierung von SLAM (CD150) als zellulären Rezeptor für Masernviren

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

vorgelegt von

Christian Erlenhöfer

aus

Castrop - Rauxel

Würzburg, 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

Gutachter: PD Dr. Jürgen Schneider-Schaulies.....

Gutachter: Prof. Dr. Georg Krohne.....

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich diese Dissertation selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

Ich erkläre außerdem, dass diese Dissertation weder in gleicher noch in anderer Form bereits in einem Prüfungsverfahren vorgelegen hat.

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

Würzburg,

Christian Erlenhöfer

Staunen ist der erste Schritt zu einer Entdeckung

Louis Pasteur

Inhalt

1 EINLEITUNG	1
1.1 BIOLOGIE DES MASERNVIRUS	1
1.1.1 <i>Epidemiologie</i>	1
1.1.2 <i>Pathogenese der Masern</i>	3
1.2 MV IMPF-UND WT-STÄMME	5
1.3 TAXONOMIE UND STRUKTUR	7
1.4 MV-REPLIKATION UND GENOMAUFBAU	9
1.5 VIRUSREZEPTOREN	11
1.5.1 <i>Virusrezeptoren allgemein</i>	11
1.5.2 <i>Zellulärer Rezeptor (CD46) für MV- Impfstämme</i>	13
1.5.3 <i>Zellulärer Rezeptor für MV-Wildtypstämme</i>	15
1.6 ZIELE DER ARBEIT	17
2 MATERIAL	18
2.1 ZELLEN	18
2.2 VIREN	19
2.3 BAKTERIEN	20
2.4 PLASMIDE	21
2.4.1 <i>h-SLAM EGFP-N3</i>	21
2.4.2 <i>pECFP-ER, pECFP-Golgi</i>	21
2.5 VIRO PORT™ CDNA EXPRESSIONSGENBANK	22
2.6 ANTIKÖRPER	23
2.6.1 <i>Primärantikörper</i>	23
2.6.2 <i>Sekundärantikörper</i>	24
2.7 OLIGONUKLEOTIDE (PRIMER)	25
2.8 ENZYME	26
2.9 LÖSUNGEN UND PUFFER	26
2.9.1 <i>Bakterienkultur</i>	26
2.9.2 <i>Zellkultur</i>	26
2.9.3 <i>Molekularbiologie</i>	28
2.9.4 <i>Proteinbiochemie</i>	29
2.10 KITS	31
2.11 VERBRAUCHSMATERIAL	31
2.12 GERÄTE	31
3 METHODEN	33
3.1 ZELLBIOLOGISCHE METHODEN	33
3.1.1 <i>Zellkultur adhärenter Zellen</i>	33
3.1.2 <i>Zellkultur von Suspensionszellen</i>	33
3.1.3 <i>Isolierung primärer humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut</i>	33
3.1.4 <i>Kultur von Hybridomzellen zur Antikörpergewinnung</i>	34
3.1.5 <i>Einfrieren und Auftauen von Zellen</i>	34
3.1.6 <i>Mycoplasmamentest</i>	35

3.1.7	<i>Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit Lipofektamine 2000 Transfektionsreagenz</i>	35
3.2	VIROLOGISCHE METHODEN.....	36
3.2.1	<i>MV-Produktion</i>	36
3.2.2	<i>Ultrazentrifugation von Virus-Präparationen</i>	36
3.2.3	<i>Bestimmung von Virustitern durch Endpunkttitration</i>	37
3.2.4	<i>TCID₅₀ Test (50 % - Endpunkttitration)</i>	37
3.2.5	<i>Virusbindungs-Assay</i>	38
3.2.6	<i>Infektions-Assay</i>	38
3.2.7	<i>Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie</i>	39
3.2.8	<i>Immunfluoreszenzfärbung in Chamber Slides</i>	40
3.2.9	<i>Magnetische Selektion von Zellen</i>	41
3.2.10	<i>Infektion mit pFB-Luc (Luciferase) retroviralem Überstand</i>	41
3.2.11	<i>Zellsortierung im FACS-Sorter</i>	42
3.2.12	<i>Herstellung von Mowiol®</i>	42
3.3	MOLEKULARBIOLOGISCHE METHODEN.....	43
3.3.1	<i>Plasmid Restriktion</i>	43
3.3.2	<i>Dephosphorylierung des Plasmidvektors</i>	43
3.3.3	<i>Ligation</i>	44
3.3.4	<i>DNA-Sequenzierung mit Rhodamin und dRhodamin-Terminatoren</i>	44
3.3.5	<i>Reverse Transkription</i>	45
3.3.6	<i>Polymerase-Ketten-Reaktion</i>	46
3.3.7	<i>Herstellung kompetenter Bakterien</i>	47
3.3.8	<i>Transformation von Bakterien</i>	47
3.3.9	<i>Isolation extrachromosomaler DNA aus Bakterien (Maxi-Präparation)</i>	48
3.3.10	<i>Isolation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen</i>	48
3.3.11	<i>Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen</i>	49
3.3.12	<i>DNA und RNA Gelelektrophorese</i>	49
3.4	PROTEINSPEZIFISCHE METHODEN.....	50
3.4.1	<i>Reinigung von monoklonalen Antikörpern</i>	50
3.4.2	<i>Immunpräzipitation</i>	51
3.4.3	<i>Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)</i>	52
3.4.4	<i>Proteinauftrennung im Dichtegradienten (nach Didio et al.)</i>	53
3.4.5	<i>Western-Blot</i>	53
3.4.6	<i>Dot-Blot</i>	54

4 ERGEBNISSE.....55

4.1	CHARAKTERISIERUNG DES MONOKLONALEN ANTIKÖRPERS 5C6.....	55
4.1.1	<i>Isotypbestimmung des monoklonalen Antikörpers 5C6</i>	55
4.1.2	<i>Inhibition der WTFb-Bindung an B95a Zellen durch mAK 5C6</i>	56
4.2	IDENTIFIZIERUNG VON SLAM (SIGNALING LYMPHOCYTIC ACTIVATION MOLECULE, CD150) ALS REZEPTOR FÜR MASERNVIREN.....	58
4.2.1	<i>Luciferasetest der CHO Zellen auf Infektion mit retroviralem Überstand</i>	59
4.2.2	<i>Transduktion I der ViraPortTM VSV-G retroviralen cDNA Genbank</i>	61
4.2.3	<i>FACS-Sortierung der Retrovirus-infizierten CHO Zellen mittels AK 5C6</i>	61
4.2.4	<i>Transduktion II der ViraPortTM VSV-G retroviralen cDNA Genbank</i>	62
4.2.5	<i>Sortierung der Genbank Transduktion II mit Magnet-Beads</i>	62

4.2.6	2. Sortierung der Transduktion I+II mit Magnet-Beads	63
4.2.7	2. FACS-Sortierung der Genbankinfizierten CHO Zellen mit AK 5C6.....	63
4.2.8	3. Sortierung der Genbankinfizierten CHO Zellen mit AK 5C6.....	63
4.2.9	Subklonierung der transformierten CHO-Zellen.....	65
4.2.10	DNA Extraktion der selektierten Zellen (Klon E).....	66
4.2.11	PCR der genomischen DNA aus den selektierten Zellen.....	67
4.2.12	Kommerziell erhältliche Antikörper erkennen CD150 auf der Oberfläche der selektierten CHO Zellen	69
4.2.13	5C6 erkennt SLAM auf der Oberfläche von B95a Zellen und PBL.....	71
4.2.14	Bindungsinhibition an PBMC durch AK 5C6 oder CD46.....	72
4.2.15	SLAM Protein Expression der selektierten CHO-SLAM Zellen.....	75
4.3	SLAM mRNA-EXPRESSION VERSCHIEDENER ZELL-LINIEN	76
4.4	BINDUNG VON WTFB UND EDM AN SLAM-TRANSDUZIERTE CHO ZELLEN.....	78
4.5	SYNZYTIENBILDUNG VON CHO-SLAM ZELLEN	79
	NACH INFEKTION MIT WTFB ODER EDM	79
4.6	INFEKTION UND REPLIKATION VON WTFB AUF CHO-SLAM-ZELLEN	80
4.7	REZEPTORBENUTZUNG VERSCHIEDENER MASERNVIRUSSTÄMME	81
4.8	SLAM DOWNREGULATION VON DER ZELLOBERFLÄCHE	87
4.8.1	SLAM wird nach Infektion mit WTFb von der Zelloberfläche herunterreguliert.....	87
4.8.2	SLAM Downregulation von der Oberfläche von BJAB-Zellen nach Infektion mit WTFb	89
4.8.3	SLAM Downregulation von der Oberfläche von PBL.....	90
4.8.4	SLAM Downregulation von der Zelloberfläche von CHO-SLAM Zellen nach Kontakt mit BJABpWTW-Zellen	92
4.8.5	SLAM Downregulation von der Oberfläche von B95a Zellen nach Kontakt mit BJABpWTFb	93
4.8.6	SLAM Kontaktdownregulation von B95a Zellen nach Kontakt mit BJABpWTF in verschiedenen Verhältnissen	95
4.8.7	SLAM Downregulation von der B95a Zelloberfläche nach Kontakt mit UV inaktiviertem Virus	97
4.8.8	Transfektion hSLAM-EGFP	98
4.8.9	Capping von SLAM nach Kontakt mit 5C6 Antikörper.....	99
4.8.10	SLAM Modulation und Agglutination nach MV Infektion.....	101
4.8.11	SLAM bildet Adhäsionsplaques zwischen Nachbarzellen	103
4.8.12	Proteinauftrennung im Dichtegradienten.....	105

5 DISKUSSION.....108

5.1	IDENTIFIZIERUNG VON SLAM DURCH SCREENING EINER HUMANEN PBL CDNA EXPRESSIONS-GENBANK UND MAK 5C6	108
5.2	ZELLULÄRE VERTEILUNG UND NATÜRLICHE FUNKTION VON SLAM	113
5.3	SLAM ALS REZEPTOR FÜR MASERNVIREN	117
5.4	REZEPTORBENUTZUNG VERSCHIEDENER MV-STÄMME	118
5.5	SLAM DOWNREGULATION VON DER ZELLOBERFLÄCHE	120
5.6	SCHLUßFOLGERUNGEN	122

6 ZUSAMMENFASSUNG	124
7 SUMMARY	125
8 LITERATURVERZEICHNIS.....	126
9 ABKÜRZUNGEN	138
10 LEBENSLAUF.....	141
11 VERÖFFENTLICHUNGEN	143
11.1 PUBLIKATIONEN.....	143
11.2 POSTERPRÄSENTATIONEN	144
11.3 VORTRÄGE.....	144
12 DANKE !	145

1 Einleitung

1.1 Biologie des Masernvirus

1.1.1 Epidemiologie

Die akute Maserninfektion gehört noch immer zu den gefährlichsten Infektionskrankheiten des Menschen. Im Jahr 2000 kam es weltweit zu schätzungsweise 30-40 Millionen Fällen von Maserninfektionen mit ungefähr 770.000 Todesfällen. Damit machen Masern etwa die Hälfte der 1,7 Millionen jährlichen Todesfällen bei Kindern aus, die durch Impfung verhindert werden könnten. Masern bleibt damit weiterhin eine führende Todesursache bei Kindern. 5 % aller Todesfälle bei Kindern unter 5 Jahren wurde durch Masern verursacht (WHO 2002). Die hohe Sterberate bei Masern, v.a. bei Kleinkindern in der Dritten Welt, ist die Folge einer mehrere Wochen anhaltenden viral verursachten Immunsuppression und daraus resultierenden Komplikationen in Form von opportunistischen Infektionen des Respirations- und Gastrointestinaltraktes. Als Komplikationen treten oft Lungen- oder Mittelohrentzündungen auf. Häufig ist auch eine Enzephalitis zu finden, die zu bleibenden Hirnschädigungen führen kann. Die problematische Ernährungslage, die mangelnde Hygiene und die schlechte medizinische Versorgung weiter Teile der Bevölkerung in der Dritten Welt sorgen dafür, dass Masern dort die häufigste Todesursache bei Kindern ist.

Seit etwa 30 Jahren steht zur Bekämpfung der Maserninfektion ein Impfstoff zur Verfügung, der einen lebenslangen Schutz bieten kann. In den USA (Vitek *et al.*, 1999) konnte gezeigt werden, dass die Infektionsrate bei nichtimmunisierten Kindern (7 von 16, 44 %) bedeutend höher ist als bei einmalig immunisierten Kindern (10 von 320, 3 %). Durch eine zweite Immunisierung konnte die Zahl der Infektionen sogar auf 0 % (von 289) reduziert werden.

Dennoch traten in den letzten Jahren vereinzelt Epidemien auf, wie beispielsweise zwischen 1989 und 1991 in den USA mit über 55.000 Fällen (Atkinson *et al.*, 1992) und 1992 in England (Jin *et al.*, 1997). Im Oktober 1997 wurden in Brasilien 61.000 Masernfälle gemeldet, davon allein 48.000 im Staat Sao Paulo, für den im Jahr zuvor nur 15 gesicherte Masernfälle registriert worden waren (Momen 1998). 1998 wurden in Europa noch 7.000 durch Maserninfektion verursachten Todesfälle registriert (WHO 1999). In Deutschland kam es Ende Oktober 2001 in Coburg, im Landkreis Miltenberg/Unterfranken zu einer größeren Masernepidemie. Zu Beginn wurden wöchentlich 20 bis 30 Fälle

gemeldet mit einem Maximum von 131 Meldungen in der 5. Meldewoche. Insgesamt wurden 1.166 Masernerkrankungen gemeldet. Die Ursache dieser Epidemie lag in der niedrigen Durchimpfungsrate von nur 75 % in Coburg. In den Nachbarkreisen konnte eine Durchimpfungsrate von über 90 % nachgewiesen werden. Hier kam es nur zu sporadischen Fällen. In Coburg konnte die Epidemie nur durch eine Riegelungsimpfung gestoppt werden. Dennoch mussten 43 Personen, davon die Hälfte Kleinkinder, mit Komplikationen stationär behandelt werden. Es wurden Pneumonien, Bronchitis media, Krämpfe sowie Enzephalitiden gemeldet. Glücklicherweise kam es hier nicht zu Todesfällen. Da mind. 94 % der Erkrankten ungeimpft war, zeigt sich hier deutlich die Notwendigkeit einer hohen Durchimpfungsrate (Epidemiologisches Bulletin, 2002)

Insbesondere in Entwicklungsländern ist daher das Erreichen einer hohen Durchimpfungsrate essentiell für eine erfolgreiche Bekämpfung von Masernerkrankungen. Für die flächendeckende Versorgung der Bevölkerung in Entwicklungsländern wirkt sich neben allgemeiner logistischer Probleme auch die Thermolabilität des Impfstoffes negativ aus.

Ein weiteres Problem zeigt sich bei Säuglingen im Alter zwischen 6 und 12 Monaten. Während dieser Zeit sind die Säuglinge nicht mehr durch maternale Antikörper vor einer Maserninfektion geschützt, sie verhindern jedoch eine Immunisierung durch den bestehenden Impfstoff (Garenne *et al.*, 1991; Aaby *et al.*, 1993). Es besteht während dieser Zeit also keinerlei Schutz gegen eine Masernvirusinfektion.

Die dargestellte Problematik lässt die Entwicklung neuer, temperaturstabiler Impfstofftypen oder solcher, die durch maternale AK nicht neutralisiert werden, als dringend erforderlich erscheinen. Diese Impfprobleme in den Entwicklungsländern veranlasste die WHO verbesserte Programme zur Prävention, Erforschung der Pathogenität und Entwicklung einer neuen Vakzine, zu verabschieden. Ein erklärtes Ziel der WHO ist die weltweite Eliminierung der Masern, wie es mit Pocken bereits erreicht werden konnte (WHO 1992). In einigen Regionen, insbesondere in gesamt Amerika, zeigen sich bereits bedeutende Erfolge in der Bekämpfung von Maserninfektionen. Weltweit konnte die Zahl der Infektionen zwischen 1990 und 1997 um 74 % und die Zahl der Todesfälle sogar um 85 % reduziert werden. In Süd-Ostasien sogar um 88 % (MMWR Rep., 1999). Eine schwere und uncharakteristische Maserninfektion konnte bei HIV-Patienten nachgewiesen werden (Moss *et al.*, 1999). Ein Faktor, der die Kontrolle von Masernvirus epidemien zusätzlich erschwert, da gerade in Ländern mit starker Durchseuchung auch der Anteil an HIV-Patienten dramatisch ansteigt. Bei HIV infizierten Kindern konnte zudem auch nach zweimaliger Immunisierung kein ausreichender Schutz vor Masernvirusinfektion vermittelt werden. Es muss daher auch weiterhin Ziel bleiben, die Infektionswege der Masernviruswildstämme zu erforschen und neue effizientere Vakzinen zu entwickeln.

1.1.2 Pathogenese der Masern

Das Masernvirus verursacht die Masern, eine Erkrankung die durch starke katarrhalische Erscheinungen der oberen Luftwege und ein typisches Exanthem gekennzeichnet ist. Die Übertragung erfolgt durch Tröpfcheninfektion, wobei eine Übertragung auch über größere Entfernungen möglich ist. Die Infektion ist dabei auf den Menschen beschränkt. Die Inkubationszeit beträgt in der Regel 10-14 Tage. Die Ansteckungsfähigkeit beginnt bereits 1-2 Tage vor den sichtbaren Erscheinungen.

Die Masernerkrankung verläuft in 3 klinischen Stadien. Im Prodromalstadium zeigen sich vor allem Erscheinungen der oberen Atemwege mit Koplikschen Flecken der Mundschleimhaut. Das Exanthemstadium dauert etwa drei Tage und ist mit einem Fieberanstieg auf 39-40 °C verbunden. Das typische Exanthem beginnt hinter den Ohren und verbreitet sich über Hals, Gesicht, Schultern und Rumpf bis zu den Extremitäten. Im Rekonvaleszenzstadium ist das Exanthem bereits abgeklungen, es bleibt aber eine Anfälligkeit gegenüber anderen Erkrankungen (Pschyrembel 258).

Das Virus gelangt über die Atemwege in den Körper und führt anschließend zu einer systemischen Infektion. Primär werden die Epithelzellen im Respirationstrakt sowie Dendritischen Zellen (DC) infiziert, die das Virus in die lymphatischen Gewebe transportieren. Nach einer lytischen Virusvermehrung in den lokalen Lymphknoten kommt es zu einer virämischen Phase und einer Verbreitung des Virus im Körper. Über infizierte Monozyten, Makrophagen, B- und T-Zellen werden Epithelzellen und Endothelzellen in verschiedenen Organen, wie Leber, Niere, Gastrointestinaltrakt, Lunge und Haut infiziert. In den infizierten Makrophagen wird das Adhäsionsmolekül LFA-1 verstärkt auf der Zelloberfläche exprimiert was den Zelleintritt in Gewebe erleichtert und die Verbreitung des Virus fördert (Attibele *et al.*, 1993). Während der Virämie entsteht das Exanthem (Kempe *et al.*, 1965; Moench *et al.*, 1988; Esolen *et al.*, 1993). Verursacht wird es durch direkte virusbedingte oder toxisch-allergische Permeabilitätssteigerung von Gefäß- und Zellwänden. Dies führt zu einem hämorrhagischen Einschlag des Exanthems und kann außerdem Endothelschäden im Bereich der Lungenkapillaren verursachen (Pschyrembel 1997). Zu diesem Zeitpunkt befindet sich das Virus auch in den peripheren Leukozyten des Blutes.

Die Maservirusinfektion ist mit einer durch das Virus induzierten Immunsuppression verbunden, die über mehrere Wochen nach Ausbruch des Exanthems anhalten kann. Aus infizierten Epithelzellen in Mund und Rachenbereich ist eine Isolation von MV aus Rachenabstrichen möglich und auch in den Konjunktiva des Auges befinden sich Viren in den Epithelzellen, die durch Abstriche isoliert werden können. Masernviren werden mit dem Urin aus dem Körper ausgeschieden, was eine Virusisolation

aus Makrophagen im Urin erlaubt. Zudem kann Virus aus infizierten peripheren mononukleären Zellen des Blutes isoliert werden (Enders, 1962; Lightwood und Nolan, 1970).

Außer der akuten Infektion mit der Problematik opportunistischer Infektionen und der postinfektiösen Masern-Enzephalitis (mit einer Frequenz von 10^3) können als seltene, aber fatale Spätfolgen einer akuten MV-Infektion die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE, mit einer Frequenz von 10^6) und bei immunsupprimierten Patienten, die Masern-Einschlußkörperchen-Enzephalitis (MIBE, ebenfalls mit einer Frequenz von 10^6) auftreten, die stets tödlich verlaufen (ter Meulen *et al.*, 1983; Billeter und Cattaneo, 1991). Die Analyse von Autopsiematerial betroffener Patienten ergab hierbei, dass die virale Genexpression auf verschiedenen Ebenen restringiert ist, wobei vor allem Mutationen in MV-Genen zu finden sind, die mit dem Zusammenbau (Assembly) und der Knospung der Nachkommen-Virionen interferieren. Da gleichzeitig bei ca. 50 % der akuten Infektionen Veränderungen im Elektroenzephalogramm der Patienten zu beobachten sind, ohne dass das MV im ZNS nachweisbar wäre, scheint das MV trotz der niedrigen Frequenz apparenter neurologischer Erkrankungen in vielen Fällen vorübergehende Irritationen des ZNS auszulösen (Gibbs *et al.*, 1959; Hanninen *et al.*, 1980). Durch eine Masernimpfung kann das Auftreten der SSPE völlig verhindert werden und die akute postinfektiöse MV-Enzephalitis wird auf eine Frequenz von 10^6 reduziert (Duchas *et al.*, 1998).

1.2 MV Impf-und Wildtyp-Stämme

Bei MV handelt es sich um ein monotypisches Virus. Durch Impfung mit einem Typ kann eine lebenslange Immunität gegen alle Typen erreicht werden (Tamin *et al.*, 1994). Trotzdem können eine Reihe von Impfstämmen und Wildtyp-Isolaten hinsichtlich der genomischen Sequenz unterschieden werden. Damit verbunden ist auch meist eine Phenotypänderung, die sich zum Beispiel durch eine veränderte Bindung von mAK äußert. Anhand der MV-H oder MV-N Nukleotidsequenzen können die MV-Isolate verschiedenen Stämmen zugeordnet werden. (Rima *et al.*, 1995 a,b und 1997; Rota *et al.*, 1992 und 1994).

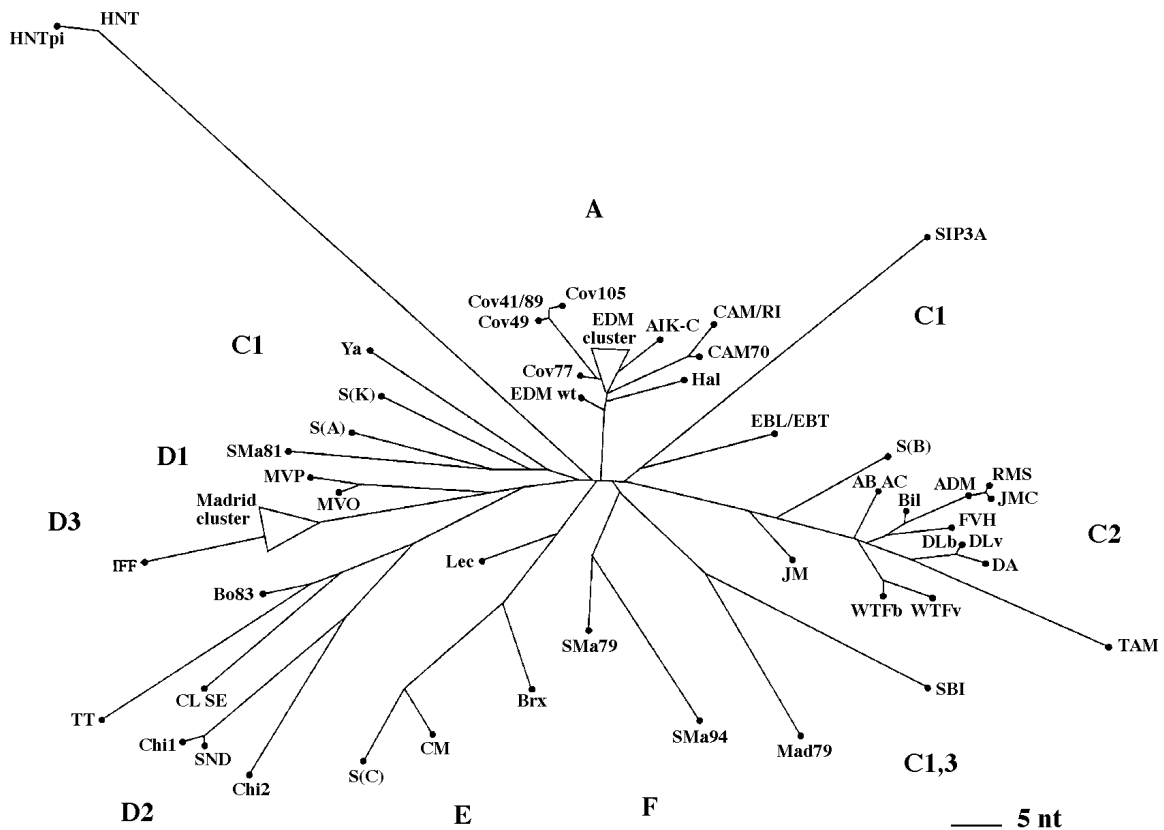


Abb. 1-1 Verwandtschaftsbeziehungen von MV-Isolaten auf Grundlage von Variationen im H-Protein (Rima *et al.*, 1997). Gekennzeichnet ist die Gruppe C2, in welche das in dieser Arbeit hauptsächlich verwendete Wildtyp Virus WTFb gehört.

Von den sechs Strukturgenen im MV Genom sind die H- und N-Gene die variabelsten. Der variabelste Bereich des gesamten MV-Genoms sind die 450 Nukleotide des C-Terminus des N-Proteins. Hier treten Sequenzunterschiede von bis zu 12 % auf. Beim H-Protein treten Variationen vor allem zwischen den AS 167 und 241 auf, in denen die 5 Glykosylierungsstellen lokalisiert sind. Die Variation auf AS-Ebene beträgt bis zu 8 %. Das F-Protein ist das konservierteste Protein.

Zusätzlich zur Einteilung nach der Sequenz können die MV-Stämme auch nach ihren spezifischen Eigenschaften unterteilt werden, wie der Art des zytopathischen Effektes (CPE) (Rapp, 1964; Gould *et al.*, 1976), nach Temperaturabhängigkeit des Wachstums (Bergholz *et al.*, 1975), nach Hämagglutinationsfähigkeit (Gould *et al.*, 1976) und nach der Fähigkeit zur Herabregulation von CD46 (Schneider-Schaulies *et al.*, 1995a).

Die Einteilung in Gruppen auf der Basis von MV-H Sequenzen zeigt die verwandtschaftlichen Beziehungen einer Reihe von MV-Isolaten (**Abb. 1-1**). Diese Einteilung in Gruppen nach Genotypen spiegelt die Zeitpunkte, Isolationsorte und die Passagierungsgeschichte der Isolate wieder.

Die **Gruppe A** (Vakzine-Isolate) enthält den Prototyp aller MV Stämme, Edmonston (MV-Edm), der 1954 von Enders und Peebles isoliert wurde (Enders *et al.*, 1954) und alle Vakzine Stämme die von Edm abgeleitet wurden, wie Attenuvax (Moraten), Edmonston-Zagreb, Schwarz und AIK-C. Auch einige zeitlich und geographisch unabhängig voneinander gewonnene Wildtyp-Isolate gehören in diese Gruppe wie z.B. CAM-70 aus Japan. Die wenigen bekannten Wildtyp-Isolate aus der Zeit vor dem Einsatz der ersten Lebendvakzine, gehören ebenfalls alle in die Gruppe A, d.h. diese Gruppe muss schon vor dem Einsatz der ersten Vakzine weit verbreitet gewesen sein. Die **Gruppe C2** repräsentiert die in Europa vorherrschenden Virusstämme, v.a. Isolate aus Deutschland, Spanien und Großbritannien. Zu dieser Gruppe gehört auch das in dieser Arbeit vorwiegend verwendete WTFb-Virus.

Zur **Gruppe D2** gehören Viren die zuerst in den 80er Jahren in Japan isoliert wurden und die zwischen 1989 und 1991 zum Wiederauftreten einer Masernepidemie in den USA beigetragen haben, z.B. Chicago-1.

1.3 Taxonomie und Struktur

Das MV ist ein einzelsträngiges RNA-Virus, dessen Genom in Negativstrangorientierung vorliegt. Das MV wird zur Familie der Paramyxoviren gezählt, in welcher es zum Genus der Morbilliviren gehört. Zu den tierpathogenen Morbilliviren gehören unter anderem das Hundestaupe (CDV) sowie das Rinderpestvirus.

Sie werden von den anderen Genera der Unterfamilie Paramyxoviridae abgegrenzt. Zu denen gehören die Paramyxoviren mit den humanen Parainfluenzaviren sowie dem murinen Sendai-Virus und im Genus der Rubulaviren das humane Mumpsvirus sowie das Newcastle-Disease-Virus.

Das infektiöse Viruspartikel besitzt eine pleomorphe Form mit einem Durchmesser von 100 - 300 nm. Die Virushülle wird von einer Lipiddoppelschicht gebildet, in die die viralen Glykoproteine H (Hämagglutinin) und F (Fusionsprotein) eingelagert sind. Zur Innenseite wird die Hülle durch das M-Protein (Matrix-Protein) abgegrenzt. Im Innern des Viruspartikels befindet sich der helikale Ribonukleoproteinkomplex (RNP-Komplex). Der RNP-Komplex wird von der viralen RNA, dem N-Protein (Nukleokapsidprotein), dem P-Protein (Phosphoprotein) sowie dem L-Protein („Large“- Protein), der RNA-abhängigen RNA-Polymerase, gebildet (**Abb. 1-2**).

Das **M-Protein** (36 kD) verbindet den RNP-Komplex mit der Virushülle und bildet die Proteinschicht an der Membraninnenseite. Außerdem ist das M-Protein am Assembly der Viruspartikel beteiligt.

Das **H-Protein** (80 kD) ist in der Membran verankert und interagiert mit dem zellulären Rezeptor. Der Name bezeichnet die *in vitro* Hämagglutination von Affenerythrozyten. Affenerythrozyten tragen im Gegensatz zu humanen Erythrozyten CD46 auf der Zelloberfläche, das mit dem Hämagglutinin der MV-Vakzinestämme interagiert. Das H-Protein gehört zur Gruppe der Membranproteine vom Typ II und besitzt eine hydrophobe Sequenz am aminoterminalen Ende, die als Signalsequenz zum Transport des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum (ER) dient. Das Protein kann so durch die ER-Membran geschleust werden und wird dann in der Membran verankert. Das carboxyterminale Ende wird daraufhin durch Anfügen von Zuckergruppen modifiziert. Der Transport zum Golgi-Apparat erfolgt als Dimer, wobei die Ketten über Disulfidbrücken verbunden sind. Während des Transportes werden die Zuckergruppen weiter modifiziert. An der Zelloberfläche erscheint das Hämagglutinin als Tetramer. Das H-Protein bindet den zellulären Rezeptor. Dieser Bindung geht der Fusion des F-Proteins voraus. Die Interaktion von H-Protein und zellulärem Rezeptor hat also eine entscheidende Bedeutung für die MV-Infektion

Das **F-Protein** (60 kD) ist ein Typ I glykosyliertes Transmembranprotein. Das F-Protein wird als inaktives Vorläuferprotein (F_0 , 60 kD) synthetisiert und im ER glykosyliert. Durch eine Endoprotease (vorwiegend Furin) wird das F_0 -Protein in zwei Untereinheiten F_1 (40 kD) und F_2 (20 kD) geschnitten, die über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Die F_1 Untereinheit entstammt dem carboxyterminalen Ende des F_0 -Proteins und ist in der Virushülle verankert. Das aminoterminal Ende des F_1 enthält das funktionsaktive Peptid, eine hydrophobe Region, die bei Paramyxoviren hoch konserviert ist. Die extrazelluläre Region von F_1 besitzt in der Nähe der Transmembrandomäne ein Leuzinzippermotiv sowie eine cysteinreiche Region. Das F-Protein wird an der Oberfläche als Homotrimer oder als Homotetramer exprimiert (Malvoisin *et al.*, 1993). Die F_2 Untereinheit enthält drei N-Glykosylierungsstellen, die für die Reifung, das Schneiden und die Funktion des F-Protein notwendig sind (Hu, A *et al.*, 1995). Die Funktion des F-Proteins besteht in der Fusionsvermittlung zwischen Virus- und Zellmembran. Die Expression des F-Proteins allein ist jedoch nicht ausreichend zur Membranfusion. Das F-Protein muss zusammen mit dem H-Protein exprimiert werden (Wild *et al.*, 1991).

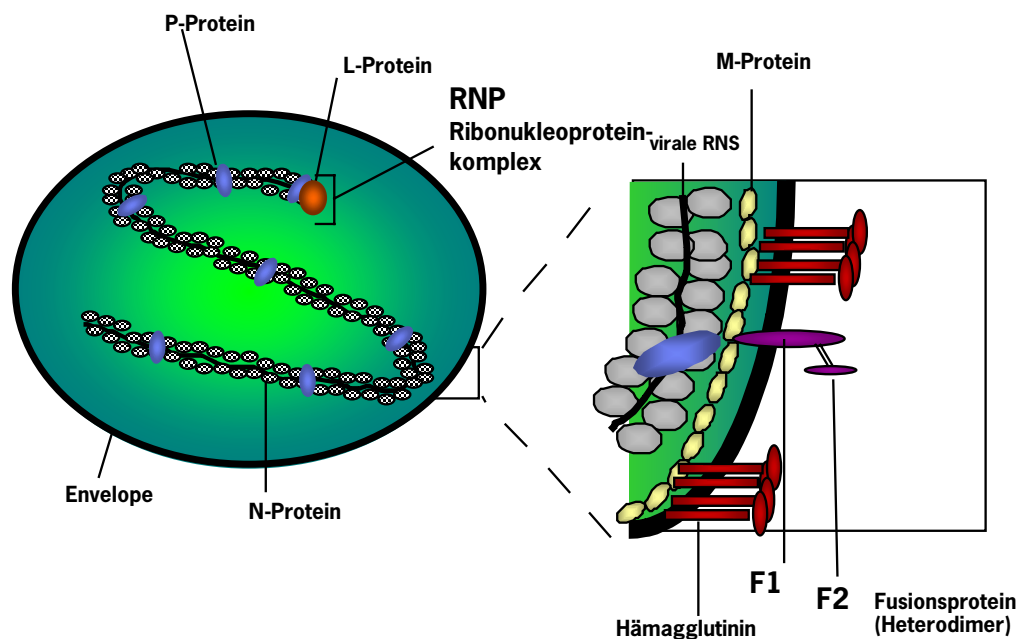


Abb. 1-2: Schematische Darstellung des Masernvirions

1.4 MV-Replikation und Genomaufbau

Der erste Schritt in der Replikation ist die Adsorption des H-Proteins an den zellulären Rezeptor, was Virus- und Zellmembran in räumliche Nähe bringt. Die Penetration erfolgt nach Konformationsänderung des F-Proteins, das sich mit den hydrophoben Anteilen in der Zellmembran verankert und so eine Fusion zwischen Virushülle und Zellmembran herbeiführt. Das Nukleocapsid mit der negativstängigen RNA kann dadurch in das Zytoplasma entlassen werden (uncoating) (Modrow *et al.*, 1997). Der MV-Impfstamm Edm bindet CD46 auf der Zelloberfläche, was den Eintritt in die Zelle ermöglicht. Durch den Mechanismus der Fusion ist die Aufnahme der viralen RNA pH-unabhängig. Außerdem scheinen keine weiteren Kofaktoren für die Virusaufnahme nötig zu sein.

Am 3'-Ende des Genoms befindet sich eine als Leader bezeichnete Sequenzfolge von 35 Basen, die nicht für Aminosäuren kodiert. Der Leadersequenz folgen die proteinkodierenden Sequenzen in der Reihenfolge 3'-N-P/C/V-M-F-H-L-5', die in drei Leserastern kodiert sind (**Abb.1-3**).

Die Leadersequenz dient der Anlagerung des Polymerasekomplexes und damit der Initiation der Transkription. Die Polymerase rückt daraufhin weiter bis zum Beginn des N-Gens und kann mit der Polymerisation beginnen. Zwischen den proteinkodierenden Sequenzen befinden sich jeweils kurze intergenische Sequenzen, die nicht für Proteine kodieren. Diese Konsensussequenzen sind konservierte Tripeptide mit der Sequenz C-U/G-U. Das Überspringen dieser intergenischen Sequenzen und erneuter Transkriptionsstart führt zu 6 verschiedenen mRNAs, die „gecappt“ und polyadenyliert werden. Bedingt durch die intergenischen Sequenzen kann es zwischen der Transkription der einzelnen Proteine auch zu einem Abbruch der Transkription kommen. Je weiter ein Protein vom 3'-Ende entfernt ist, desto wahrscheinlicher wird eine verfrühte Termination. Es entsteht dadurch ein Transkriptionsgradient, was bedeutet, dass eine große Menge N-Protein aber nur wenig L-Protein gebildet wird (Cattaneo *et al.*, 1987; Schneider-Schaulies *et al.*, 1990).

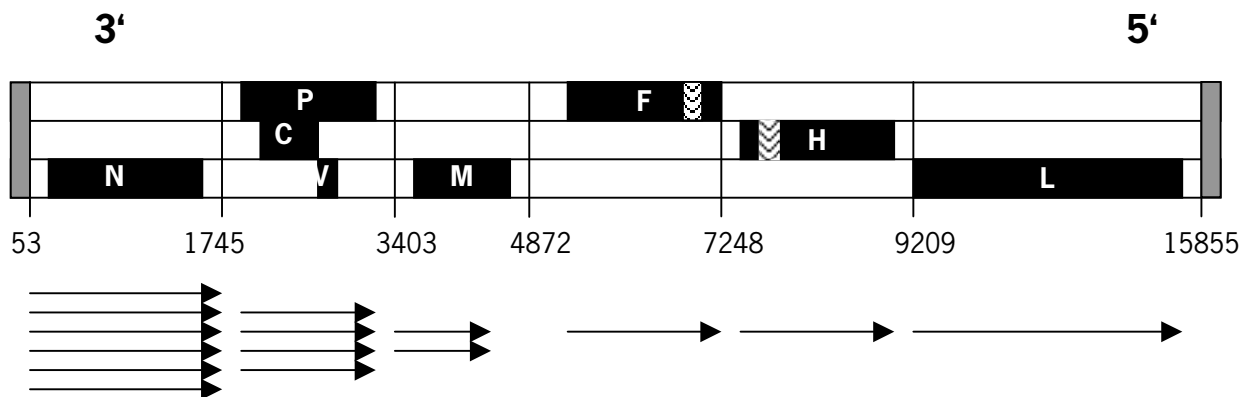


Abb. 1-3 Schematische Darstellung des MV-Genoms. Die Proteine (schwarz) sind in drei offenen Leserahmen kodiert. Das Genom beginnt mit einer Leadersequenz (grau). Die Transmembranregionen der F- und H-Proteine sind gestrichelt dargestellt. Die Pfeile zeigen den Transkriptionsgradienten.

Die Translation kann aufgrund der RNA-Modifikationen durch den zellulären Translationsapparat durchgeführt werden. Auch die weiteren Modifikationen des F- und H-Proteins greifen auf zelluläre Mechanismen des ER zurück.

Für das Umschalten von Transkription auf Replikation des Genoms ist eine ausreichende Menge des N-Proteins im Zytoplasma notwendig. Die Bildung eines neuen Virusgenoms setzt ein durchgehendes RNA-Molekül in Positivstrangorientierung voraus. Dies geschieht, indem sich das N-Protein an die RNA anlagert und dadurch eine Antitermination an den Stop-Sequenzen der Proteine bewirkt (Blumberg *et al.*, 1981). Unterstützt wird die Antitermination zudem durch eine Komplexbildung der N- und P-Proteine, die durch Wechselwirkungen mit dem L-Protein die Entstehung des Antigenoms fördert.

Zur Freisetzung neuer Viruspartikel lagern sich die M-Proteine an die Innenseite der Zytoplasmamembran an und wechselwirken mit den dort lokalisierten F- und H-Proteinen, wodurch sich eine Matrixschicht ausbildet. Diese interagiert wiederum mit dem Ribonukleinkomplex. Die Viruspartikel werden durch Budding oder Lyse der Zelle freigesetzt.

1.5 Virusrezeptoren

1.5.1 Virusrezeptoren allgemein

Die Adsorption eines Virus an die Wirtszelle ist der erste und damit ein entscheidender Schritt des Infektionszyklus. Das Virus bindet dazu einen spezifischen Rezeptor auf der Zelloberfläche. Da es der einzige Schritt im Infektionszyklus ist, der außerhalb der Zelle stattfindet, ist er ein günstiges Ziel für antivirale Agenzien und so von außerordentlichem virologischen Interesse. Virusrezeptoren sind in der Regel Oberflächenmoleküle mit spezifischen Funktionen für den Organismus an die sich das Virus evolutiv anpassen konnte. Die ersten Virusrezeptoren wurden Mitte der 80er Jahre beschrieben bei denen es sich insbesondere um Sialinsäuren handelte, die als Rezeptoren unter anderem für Influenzaviren und Coronaviren dienen (Herrler *et al.*, 1985; Vitek *et al.*, 1988). Die Expression des zellulären Rezeptors ist entscheidend für den Spezies und Zelltropismus des Virus. Auch die Pathogenese des Virus hängt von der Rezeptorbenutzung ab.

Die Virusbindung ist ein mehrphasiger Prozess. Oft ist auch mehr als ein Rezeptor daran beteiligt. Insbesondere für HIV (Humanes Immundefizienz Virus) wurden neben dem Rezeptor CD4, woran das gp120-Protein des Virus bindet, eine Reihe von Korezeptoren gefunden. Die Korezeptoren bestimmen dabei den spezifischen Tropismus des Virusstammes. Zu den Korezeptoren des HIV zählen unter anderem die Chemokinrezeptoren CXCR4 bei T-Zell-tropen HIV-1 Stämmen und CCR5 für Makrophagen-trope Stämme (Feng *et al.*, 1996; He, *et al.*, 1997; D'Souza *et al.*, 1996). Rezeptor und Korezeptor wirken bei der Virusinfektion zusammen. Durch Bindung des Rezeptors gelangt das Virus in die Nähe der Zellmembran. Die V3-Schleife des gp120-Proteins bindet daraufhin den Korezeptor, wodurch eine Membranfusion ermöglicht wird.

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

Virus	VAP	Rezeptor	Korezeptor	Literatur
Immunglobulin-ähnliche Moleküle				
Poliovirus (<i>Picornaviridae</i>)	VP1	Polio Virus Rezeptor, CD44		Mendelsohn <i>et al.</i> , 1989
Rhinovirus	VP1+3	CD54 = ICAM1		Greve <i>et al.</i> , 1981
Picornavirus	VP	IgSF (Immunglobulin Superfamilie)		Rossmann <i>et al.</i> , 2002
HIV, SIV (<i>Lentiviridae</i>)	gp120(V3)	CD4 (CDR2-loop des N-term. D1(Ig)-Moduls)	CCR1,CCR4 CCR5,CCR3,CXCR1+2, CXCR4 u.a.	Dalglish <i>et al.</i> , 1984 Dragic <i>et al.</i> , 1996 Feng <i>et al.</i> , 1996
HHV 6		CD46		Santoro, et al., 1999
<hr/>				
HHV 7 (<i>Herpesviridae</i>)		CD4		Lusso <i>et al.</i> , 1994
<hr/>				
Komplement-Rezeptoren				
EBV (<i>Herpesviridae</i>)	gp350	CD21 (CR1: SCR1+2)		McClure, 1992
Echovirus 7		CD55 (DAF: SCR2-4)		Bergelson <i>et al.</i> , 1994
Coxsackievirus B1 (<i>Picornaviridae</i>)		CD55 (DAF)	αvβ6 (Integrin)	Shafren <i>et al.</i> , 1995 Agrez <i>et al.</i> , 1997
Masernvirus (<i>Paramyxoviridae</i>)	MV-H	CD46 (MCP: SCR1+2) SLAM (CD150: V)		Naniche <i>et al.</i> ,1993 Tasuo <i>et al.</i> ,2000;Erlenhoefer <i>et al.</i> ,2001
<hr/>				
Sonstige				
Adenovirus		coxsackie-adenovirus receptor, Sialinsäure		Arnberg <i>et al.</i> ,2002
Tollwut V. (<i>Rhabdoviridae</i>)		Acetylcholinrezeptor		Lentz <i>et al.</i> , 1990
Vaccinia V. (<i>Poxviridae</i>)		EGF Rezeptor		Marsh/Eppstein 1987
Sendai-V. (<i>Paramyxoviridae</i>)		Sialinsäure		Markwell <i>et al.</i> , 1981
Influenza-V. (<i>Orthomyxoviridae</i>)		Sialinsäure		Herrler <i>et al.</i> , 1985
HCV OC43 (<i>Coronaviridae</i>)		Sialinsäure		Vlasak <i>et al.</i> , 1988
HCMV (<i>Herpesviridae</i>)		Heparansulfat		Compton <i>et al.</i> 1993
HSV (<i>Herpesviridae</i>)		Heparansulfat, TNF/NGF		WuDunn und Spear 1989
Dengue Virus (<i>Flaviviridae</i>)		Heparansulfat		Chen <i>et al.</i> 1997
Sindbis (<i>Togaviridae</i>)		Heparansulfat, Laminrezeptor		Byrnes/Griffin 1998
HCV 229E (<i>Coronaviridae</i>)		CD13 (Aminopeptidase N)		Yeager <i>et al.</i> , 1992
TGEV (<i>Coronaviridae</i>)		CD13 (Aminopeptidase N)		Delmas <i>et al.</i> , 1992
VSV (<i>Rhabdoviridae</i>)		Phosphatidylserin , P.-inositol , GM3 Gangliosid		Mastromarino 1987

Tab. 1-1: Übersicht zellulärer Virusrezeptoren

1.5.2 Zellulärer Rezeptor (CD46) für MV- Impfstämme

Als Rezeptorprotein von MV-Impfstämmen konnte das Oberflächenprotein CD46 (oder MCP, Membran-Cofaktor-Protein) ermittelt werden. CD46 gehört zur Proteinfamilie der Komplementrezeptoren (regulators of complement activation = RCA). CD46 bindet den Faktor des Komplementsystems C3b und löst seine Spaltung in C3c und C3d durch die Serinprotease Faktor-I aus (Leszewski *et al.*, 1991; Loveland *et al.*, 1993). Es schützt damit die körpereigenen Zellen vor Zerstörung durch das Komplementsystem. Neben MV wird CD46 auch von den Bakterienstämmen *Streptococcus pyogenes*, *Neisseria gonorrhoe* und *Neisseria meningitis* als Rezeptor verwendet (Atkinson *et al.*, 1994; Okada *et al.*, 1995; Kallstrom *et al.*, 1997).

CD46 wird ubiquitär auf allen humanen Körperzellen mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert. Auf Granulozyten und Lymphozyten liegt die Kopienzahl bei $5 \cdot 10^3$ bis $1 \cdot 10^4$ Molekülen pro Zelle, bei Blutplättchen nur bei 700 bis 2500. Epithelzellen können über $5 \cdot 10^5$ Kopien tragen, einige Tumorzellen sogar $1 \cdot 10^6$ (Seya *et al.*, 1990). Auf einigen Zellen des ZNS wird hingegen nur sehr wenig bis kein CD46 gefunden (Ogata *et al.*, 1997). Auch auf Zellen höherer Primaten, wie Schimpansen und Gorillas wird CD46 exprimiert, bei Alt- und Neuweltaffen, wie Orang-Utans, Makaken und afrikanischen grünen Meerkatzen CD46 sogar auf Erythrozyten.

Das CD46-Gen ist über 43 kb groß und enthält 14 Exons. Exon 1 kodiert für die Signalsequenz (leader), gefolgt von den 4 Komplement-Kontroll-Protein Domänen (CCP 1-4, 251 AS), die von den Exons 2-6 kodiert werden. Die Exons 7-9 kodieren für die ein bis drei O-glykosylierten und Serin-Threonin-Prolin-reichen Domänen (STPA, STPB, STPC, 44 AS). Das Exon 10 kodiert für eine Sequenz mit unbekannter Signifikanz (13 AS). Exon 11-12 kodieren für die Transmembran-Domäne (34 AS) und die Exons 13-14 schließlich für den zytoplasmatischen Schwanz, der durch alternatives Spleißen in zwei Varianten exprimiert werden kann (Cyt1 mit 16 AS und Cyt2 mit 23 AS). Im humanen Organismus werden mehrere höhermolekulare und mehrere niedermolekulare Isoformen des CD46 exprimiert. Das Verhältnis der Expressionsmenge dieser beiden Isoformen zueinander wird autosomal dominant vererbt. Die Exons 7 und 8, die für die STPA, STPB und STPC Domänen kodieren, können alternativ gespleißt werden. Die Expression von STPB führt zur Expression der höhermolekularen Variante mit 67 kD, das Fehlen von STPB in den Isoformen führt zur niedermolekularen Variante mit 57 kD (Barclay *et al.*, 1993; Liszewski *et al.*, 1991 und 1994, **(Abb. 1-4)**). Test der Rezeptorfunktion verschiedener Chimeren zwischen CD46 und CD55 oder CD4 zeigte, dass die SCR1+2 Domänen von CD46 notwendig und ausreichend für den MV-Eintritt in die Zelle sind (Manchester *et al.*, 1995). Wichtig für die Interaktion mit MV sind spezifische Regionen innerhalb der SCR1 zwischen 45-48 sowie Glu24,

Arg25, Pro 39 und Tyr67, aber auch die Region 85-104 und Asp70 von SCR2 (Manchester *et al.*, 2000).

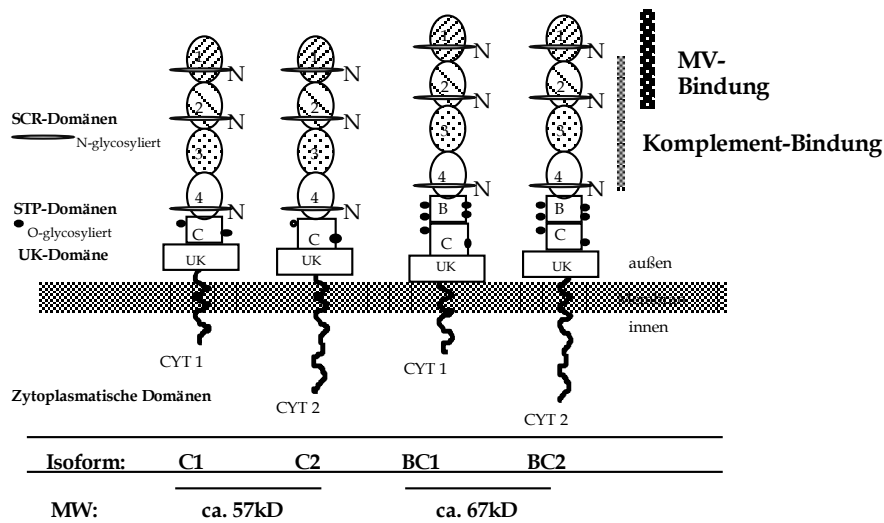


Abb. 1-4: Struktur der CD46 Hauptisoformen (nach Liszewski *et al.*, 1994). Die Bindungsstellen des Maservirus befinden sich an den äusseren SCR1+2 Domänen. Die Bindung der Komplementfaktoren geschieht über die SCR2-4-Domänen.

Nach Kontakt mit Viruspartikeln oder infizierten Zellen verursachen MV-Impfstämme eine Herabregulation (Downregulation) des CD46 von der Zelloberfläche. Eine Herabregulation wird ebenfalls durch WT-Stämme herbeigeführt, die an Vero oder HeLa Zellen adaptiert wurden, nicht aber von den meisten klinischen lymphotropen Isolaten oder Wildstämmen, die auf B-Zell-Linien passagiert wurden (Schneider-Schaulies *et al.*, 1995a; Bartz *et al.*, 1998). Die Fähigkeit zur Herabregulation kann auf einen Unterschied von nur vier Aminosäuren in Position 211, 243, 451 und 481 im H-Protein zurückgeführt werden. Durch eine gerichtete Mutagenese können nicht modulierende Wildtyp-Hämagglutinine in modulierende überführt werden (Bartz *et al.*, 1996; Bartz, 1998; Lecouturier *et al.*, 1996). Es genügt der Austausch von zwei Aminosäuren, um den WTFb-Phänotyp, der keine CD46 Herabregulation herbeiführt, in den CD46-herabregulierenden Phänotyp von Edm zu überführen. Die entscheidenden Aminosäuren sind dabei ein Glutamin auf Position 451 des WTFb, das in ein Valin überführt werden muss, sowie ein Asparaginrest an Position 481, der durch Tyrosin ausgetauscht werden muss. Durch den Austausch an Position 481 allein wird eine Herabregulation um 25 % ausgelöst (Bartz *et al.*, 1996).

Die Herabregulation verläuft biphasisch (Schneider-Schaulies *et al.*, 1996). Nach Kontakt des Viruspartikels oder infizierten Zellen kommt es innerhalb von ein bis zwei Stunden zu einer schnellen Herabregulation von CD46 von der Oberfläche, die sich während der Infektion wieder zurückbilden kann.

Erst nach der Neuexpression des MV-H in den infizierten Zellen wird CD46 entgültig von der Oberfläche entfernt (Naniche *et al.*, 1993b; Schneider-Schaulies *et al.*, 1996). Für die Herabregulation sind die gleichen Komplement-Kontroll-Protein-Domänen verantwortlich, die auch die Virusbindung ermöglichen. Sowohl die SCR-1-Domäne als auch die SCR-2 Domäne sind für eine vollständige Herabregulation notwendig, wobei die Verdopplung der SCR-1-Domäne allein eine leichte Herabregulation bewirkt (Firsching *et al.*, 1999). Mit der Herabregulation erfolgt ein Capping des CD46, wobei kontaktvermittelte Herabregulation und Capping wahrscheinlich nicht ursächlich verknüpft sind (Firsching *et al.*, 1999).

Das Fehlen von CD46 auf der Zelloberfläche führt zu einer erhöhten Empfindlichkeit der Zelle gegenüber Angriffen durch das Komplementsystem (Schnorr *et al.*, 1995). Dies könnte auch ein Mechanismus zur Attenuierung der Infektion durch Impfstämme sein.

1.5.3 Zellulärer Rezeptor für MV-Wildtypstämme

MV Wildstämme wie MV-WTFb binden hochaffin an BJAB-Zellen, nicht aber an CD46-transfizierte CHO-Zellen. Auch eine Analyse mit solubilisierten Bindungspartnern zeigt eine im Vergleich zum MV-Edm erheblich eingeschränkte Bindungsfähigkeit der WTFb-Glykoproteine an humanes CD46, was sich auch durch die nicht erhöhte Permissivität CD46-transfizierter CHO-Zellen äußert. Dies lässt auf die Existenz eines zu CD46 alternativen, funktionellen Rezeptors für das lymphotrophe WT-Isolat WTFb auf der humanen B-Zell-Linie BJAB schließen. Es könnte sich dabei entweder um einen zellspezifischen Korezeptor zum CD46 oder einen alternativen von CD46 unabhängigen Rezeptor handeln. Zahlreiche Versuche mit MV-Isolaten deuten dabei auf die Benutzung eines alternativen Rezeptors hin, da auch die Infektion von Vero-adaptierten Isolaten Edm und WTFv durch neutralisierende mAk anti-CD46 nur unvollständig gehemmt wird. Außerdem verbleibt eine sehr schwache Bindungsfähigkeit von WTFb-Glykoproteinen an humanes CD46 (Bartz, 1999).

Das CD46 der Krallenaffen-Lymphozyten-Zell-Linie B95a ist zu 76 % identisch mit dem humanen CD46, besitzt aber keine SCR1-Domäne mit der MV-Edm-Bindungsstelle. Nach Transfektion des B95a-CD46 in CHO-Zellen sind diese durch den Vakzine Stamm CAM infizierbar, nicht aber mit dem WT-Stamm Nagahata (Murakami *et al.*, 1998). Dies deutet darauf hin, dass ein anderes Protein für die starke Sensitivität der B95a-Zellen gegenüber MV-WT verantwortlich ist. Zudem inhibieren Anti-CD46 AK nur die Infektion von B95a-Zellen durch Vakzine Stämme, nicht aber durch WT-Stämme (Hsu *et al.*, 1998).

Bindungsversuche zeigten eine Bindung von MV-Stamm Halle an CD46 negative CEF (Hühnerembryo-Fibroblasten)-Zellen sowie an stabil CD46 exprimierende CHO-Zellen, nicht jedoch an CHO-Zellen ohne CD46 (Escoffier *et al.*, 1999). Dies weist darauf hin, dass CEF Zellen eine Virusbindungsstruktur exprimieren, die von CD46 verschieden ist.

Diese Befunde weisen darauf hin, dass einige Masernstämme und insbesondere die Wildstämme einen noch unbekanntem Rezeptor binden, der ihnen die Infektion der entsprechenden Zielzelle ermöglicht.

1.6 Ziele der Arbeit

Zahlreiche Versuche weisen auf die Existenz eines vom Vakzinestamm differenten Rezeptors für MV-WTFb und andere MV-Wildtypstämme hin, der bisher noch nicht ermittelt werden konnte.

B95a-Zellen zeichnen sich durch eine starke und schnelle Infektion mit MV Wildtyp Viren aus. Sie wurden daher zur Immunisierung von Mäusen verwendet. Von Siglinde Löffler wurde an unserem Institut der Antikörper 5C6 selektiert. Der monoklonale Antikörper 5C6 zeigte einen inhibitorischen Effekt bei der Infektion von B95a Zellen. Werden die Zellen mit einer MOI von 0,01 mit WTFb infiziert, sind zwei Tage nach Infektion große Synzytien zu erkennen (**Abb5.1b**). Zur Bestimmung eines inhibitorischen Effektes des mAK 5C6 wurden die Zellen vor der Infektion mit 50 µg/ml Antikörper vorbehandelt und anschließend infiziert. **Abb. 5.1c** zeigt, dass die Ausbildung von Synzytien und somit die Infektion vollständig blockiert wurde.

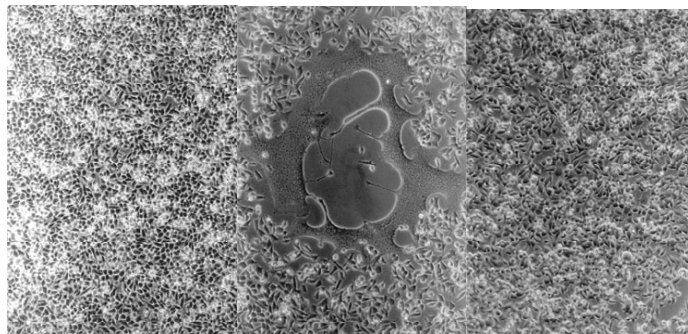


Abb. 1-5: Infektionsinhibitor durch mAK 5C6 auf B95a Zellen. Ein B95a Monolayer (**A**) wurde mit einer MOI von 0,01 mit WTFb infiziert (**B**). Nach Vorinkubation mit 50 µg/µl mAK 5C6 zeigt sich die deutliche Inhibition der Synzytienbildung (**C**).

Durch das Screenen einer eukaryotischen cDNA Expressions-Genbank mit dem monoklonalen Antikörper 5C6, sollte das gebundene Protein bestimmt werden. Ziel dieser Arbeit ist es einen von CD46 unabhängigen Rezeptor für MV Wildtypen zu identifizieren und zu charakterisieren.

2 Material

2.1 Zellen

<u>Zell-Linie</u>	<u>Zelltyp</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Literatur / Herkunft</u>
B95a	B-Zelle,EBV-transformiert	Marmoset (<i>Callithrix jachus</i>)	<i>Kobune et al., 1990</i>
BJAB	B-Zelle,EBV-transformiert	human	<i>Menezes et al., 1975</i>
BJABpWTF	persistend mit WTFb infizierte BJAB Zell-Linie	Institut für Virologie Würzburg	<i>Schnorr et al., 1997</i>
BJABpEdm	persistend mit WTFb infizierte BJAB Zell-Linie	Institut für Virologie Würzburg	<i>Schnorr et a.l., 1997</i>
CHO-K1	Epithelzelle (Ovar)	Chin. Hamster	<i>Puck TT et al., 1958</i>
CHO 5.3	CHO stabil mit CD46 transfiziert	Chin. Hamster	<i>Loveland et al., 1993</i>
Vero	Fibroblast (Niere)	Grüne Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>)	<i>Yasumura and Y. Kawakita, 1962</i> <i>Chiba University, Japan</i>
U-937	Monozytische Zelle (Lymphom)	human	<i>Sundstrom and Nilsson, 1976</i>
U-937x	CD46 defekte U937 Zell-Linie	human	
Hela	Zervixkarzinoma Epithelzell-Linie	human	<i>Scherer et al., 1953</i>
NIH3T3	Fibroblast	human	<i>ATCC</i>
Jurkat	T-Zelle, akute T-Zell-Leukämie	human	<i>Schneider et al., 1977</i>

Die verschiedenen Zell-Linien können bei der american type culture collection (ATCC) bezogen werden und waren am Institut verfügbar. Die CHO-Transfektante CHO 5.3 wurde von Bruce Loveland, Austin Research Institute, Heidelberg, Viktoria, Australien, zur Verfügung gestellt.

2.2 Viren

<u>No.) Stamm</u>	<u>Herkunft</u>	<u>Zell-Linie</u>
1) Edm	Edmonston B Vaccine/60's	Vero
2) Edm-Zagreb	Edm derived Vaccine/70's	Vero
3) Aik-C	Edm derived Vaccine/93	Vero
4) Hallé	USA/71	HeLa/Vero
5) EDW3	USA/70's	Vero
6) ELV-4	USA/70's	Vero
7) JOY-4	USA/79	HeLa/Vero
8) Mantooth	USA/69	HeLa/Vero
9) Braxator	Goettingen.DEU/71	Vero
10) LEC-12	USA/70	Vero
11) CM-3	USA/77	Vero
12) Chi- 1	Illinois.USA/89/1	Vero
13) EBL	JPN/86	HEL/Vero
14) EBT	JPN/86	HEL/Vero
15) Kohno	JPN/85	HEL/Vero
16) BIL	Bilthoven.NET/92	B-LCL
17) Wü4797	Würzburg.DEU/96/4797	BJAB
18) Wü5404	Würzburg.DEU/96/5404	BJAB
19) Wü7671	Würzburg.DEU/96/7671	BJAB
20) Wü7678	Würzburg.DEU/96/7678	BJAB
21) Wü5679	Würzburg.DEU/97/5679	BJAB
22) WTFb	Erlangen.DEU/90	BJAB
23) WTFv	-1990	Vero
24) Edtag	-1995	Vero
25) MV(WTF-F/H)Ed*	-1999	BJAB
26) MV(WTF-F)Ed*	-1999	Vero
27) MV(WTF-H)Ed*	-1999	BJAB
28) MV(WTF-H481N-Y)Ed**	-1997	Vero

Tab. 2-1: Verwendete Masernvirus Stämme. Die Tabelle zeigt die verwendeten Masernvirusstämme, sowie deren Herkunft. Zudem ist die Zell-Linie angegeben, die zur Passagierung des Virus verwendet wurde. Die rekombinanten Viren wurden von Ian Johnston (*) und P.Duprex (**) hergestellt.

2.3 Bakterien

Während der gesamten Arbeit wurde der Gram-positive Bakterienstamm *Escherichia coli* (E.coli) XL10-Gold (Stratagene: #200314) verwendet. Der Stamm XL10-Gold wurde ausgewählt aufgrund seiner hohen Transformationseffizienz mit ligierter DNA sowie supercoiled DNA. XL10-Gold sind Endonuklease defizient (*endA1*) und Rekombinationsdefizient (*RecA*). Wobei die *endA1* Mutation die Qualität der Plasmid Miniprep DNA und *recA* die Insert-Stabilität erhöht. Zudem sind Mutationen enthalten, die das Schneiden der klonierten DNA an Methylierungssites verhindern. XL-10 Gold wachsen schneller als beispielsweise XL1 Zellen, was auch größere Bakterienkolonien hervorruft.

Host strain	Genotype
XL10-Gold ultracompetent cells	<i>Tef^r Δ(mcrA)183 Δ(mcrCB-hsdSMR-mrr)173 endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hle [F' proAB lacI^qZΔM15 Tn10 (Tef) Amy Cam^r]</i>

Tab. 2-2: Übersicht Genotyp *E.coli* XL10-Gold (Stratagene)

2.4 Plasmide

2.4.1 h-SLAM EGFP-N3

Der Vektor hSLAM-EGFP-N3 wurde von Duncan Howie PHD vom Beth Israel Institut, Harvard zur Verfügung gestellt (Howie *et a.*, 2000). Die humane SLAM DNA wurde mit EcoRI 5' und Bam H 3' in den Vektor pEGFP-N3 (Clontech) geklont. Das hSLAM-Gen in der MCS wird als Fusionsprotein exprimiert mit dem fusionierenden Protein am N-Terminus. Eine Selektion kann prokaryotisch mit Kanamycin und eukaryotisch mit Neomycin (G418) durchgeführt werden.

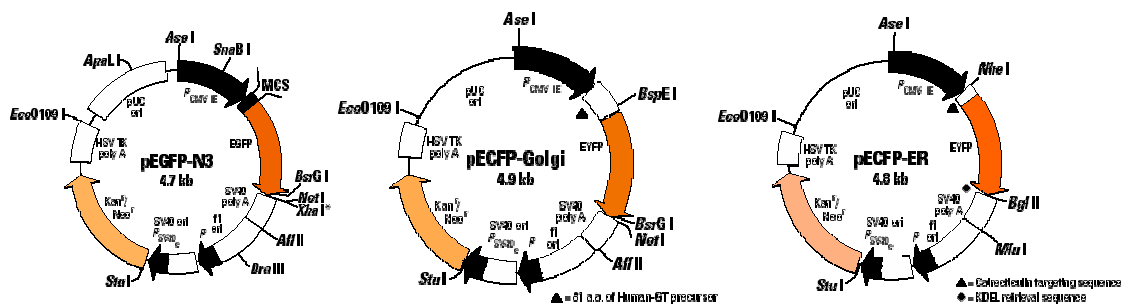


Abb. 2-1 Genkarte pEGFP-N3, pECFP-Golgi und pECFP-ER

2.4.2 pECFP-ER, pECFP-Golgi

Die Plasmide pECFP-ER und pECFP-Golgi (Clontech #6907-1, #6908-1) kodieren ein Fusionsprotein mit ECFP (enhanced cyan fluorescent protein). pECFP-ER besitzt eine Calreticulin Zielsequenz am 5' Ende und die ER Sequenz KDEL am 3' Ende. pECFP-ER ist ein lösliches Protein, das im Lumen des ER der transfizierten Zellen zu finden ist. pECFP-Golgi besitzt eine 81 Aminosäure Sequenz der humanen 1,4-Galaktosyltransferase (GT) am N-terminalen Ende. Diese GT Region codiert das Membrananker Signalpeptid, welches das Fusionsprotein in die transmedial Region des Golgi Apparates bringt. Das Fluoreszenzmaximum des ECFP liegt bei 433 nm (Hauptpeak) und 453 nm. Das Emmisionsmaximum bei 475 (Hauptpeak) und 501.

2.5 Viro Port™ cDNA Expressionsgenbank

Als cDNA Genbank wurde in dieser Arbeit ViraPort™ cDNA Library (Stratagene # 972227-41) verwendet. Dabei handelt es sich um eine cDNA Genbank in einem retroviralen Vektor. Die Genbank wurde aus der cDNA eines Pools von 5 verschiedenen humanen Milz-Gewebeprobe hergestellt, die unidirektional in den ViraPort™ pFB-XR Vektor kloniert wurde. Dazu wurde die mRNA über Stratagene cDNA Synthesis Kit in cDNA umgeschrieben. Für die Erststrangsynthese wurde ein 50 Basen Hybrid Oligonukleotid (dT) linker Primer verwendet (**2.7**) der eine XhoI Restriktionsschnittstelle enthält. Dies ermöglicht die Insertion in Senseorientierung zum MMLV-Promotor über die Restriktionsschnittstellen EcoRI und XhoI. Die EcoRI Schnittstelle wurde über eine Adaptersequenz eingefügt (**2.7**). Der Vektor basiert auf einem retroviralen MMLV-Vektor, ist aber replikationsinaktiv. Die Insertkapazität beträgt 8,0 kb. Insgesamt enthält die Genbank $1 \cdot 10^6$ unabhängige cDNA Klone in Form von retroviralem Kulturüberstand.

2.6 Antikörper

2.6.1 Primärantikörper

Antikörper (Subtyp)	Spezifität	Herkunft/Typ (Maus/monoklonal)	Hersteller
5C6	SLAM (CD150)	M/m	S.Löffler
CDw150	SLAM (CD150)	M/m	Pharmingen 559591
IPO3	SLAM (CD150)	M/m	
F227	MV-N	M/m	S.Löffler
L77 (IgG2a)	MV-H (Epitop F ¹)	M/m	S.Löffler
13/42	CD46 SCR-1	M/m	S.Löffler
B97	CD46 SCR-1	M/m	S.Löffler
10/88	CD46 SCR-3/4	M/m	S.Löffler
Anti- Mannose Rez.	Mannose-Rezeptor	M/m	Pharmingen 35971A
Anti-hCD25	IL2-Rezeptor	M/m	Biotrend 9MOB153
Anti-hCD71	CD71	M/m	Pharmingen 32001A
Anti-hCD69	CD69	M/m	Pharmingen 31951A
Anti-hCD44	CD44	M/m	Pharmingen 31211A
Anti-hCD38	CD38	M/m	Biotrend 92125-3808
Anti-hCD80	CD80	M/m	Pharmingen 36791A
Anti-hB7-2	B7-2	M/m	Santa Cruz Biotech

Anti-hCD59	CD59	M/m	Biotrend 9 2125-5905
Anti-hCD121	CD121a	M/m	Pharmingen 33321D
Anti-hCD107	CD107	M/m	Pharmingen 34201A
H036-1.1	CD99	M/m	Biotrend 9 2125-9908
Anti-hCD97	CD97	M/m	Pharmingen 33911A
Anti-hCD74	CD74	M/m	Pharmingen 32131A
Anti-hCD80	CD80	M/m	Pharmingen 557223
Anti-hCD126	CD126	M/m	Pharmingen
Anti-hCD10	CD10	M/m	Leinco Techn. C137
Anti-hCD19	CD19	M/m	Leinco Techn. C141X
Anti-hCD97	CD97	M/m	Pharmingen 33911A

Die monoklonalen Antikörper gegen MV-Antigene und gegen CD46 wurden am Institut von S. Löffler hergestellt.

2.6.2 Sekundärantikörper

Kaninchen-anti-Maus (Fc), FITC

Peroxidase-conjugated Goat Anti-mouse

AlexaFluor 594 goat anti-mouse IgG

AlexaFluor 488 goat anti-mouse IgG

Dako: F0261

Dianova: 115-035-003

Molecular Probes: A-11005

Molecular Probes: A-11001

2.7 Oligonukleotide (Primer)

Primerbezeichnung	Sequenz 5'-3'	Spezifität
5' Retro primer	GGCTGCCGACCCCGGGGTGG	pFB Vektor
3' pFB primer	CGAACCCAGAGTCCCGCTA	pFB Vektor
pFB1	CTCTAGACTGCCGGATCGAAT	pFB Vektor
pFB2	GAAGAACTCGGATCGCGGGCCG	pFB Vektor
pFB3/1,7kb	GAATCTCACCCCTGGGGATACG	SLAM (CD150)
pFB3/1,4kb	AAGCTCTTCCTGGGGACAATG	SLAM (CD150)
SLAM1	CTCCTCATTGGCTGATGGATCC	SLAM (CD150)
SLAM2	CACCATGATGAGAATCATGATG	SLAM (CD150)
SLAM3	AGTGTATGCTGGGCTGTTAGGG	SLAM (CD150)
SLAM4	CACCCTTCGGCCTCTATTCACC	SLAM (CD150)
SLAM5	ATCACTGGAGAACAGTGT	SLAM (CD150)
SLAM6	CCCAGCGTACACTGCCC	SLAM (CD150)
SLAM7	GCTCAGGACCCTTGACCACCA	SLAM (CD150)
SLAM8	GGGCCTGTGGCCAGGTTCAAGT	SLAM (CD150)
SL9	GACTTTGGGCATCTTGCTCTT	SLAM (CD150)
SL10	GCCTCAGTTTCTCTCTCAGGA	SLAM (CD150)
SL11	GCCAGGGAGAGAAACAGCACG	SLAM (CD150)
SLAM-D1	GAGGGGTCTGTCCTGCATCCGG	SLAM (CD150)
SLAM/D12	GAGGGGTCTGTCCTGCATCCGG	SLAM (CD150)
W1	CCTGCTGGTTCTGATACATAAA TCAGACAGCC	SLAM (CD150)
W2	GCCCAAAGATTCTCCGGCAGTT GGGAAGC	SLAM (CD150)
dT Erststrangprimer	GAGAGAGAGAGAGAGAGAGAA CTAGTCTCGAG(T) ₁₈	Poly A
Adapter	5' AATTCGGCACGAGG 3' 3' GCCGTGCTCCp 5'	Adapter für cDNA Library

Tab. 2-3: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide und deren Spezifität

2.8 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	MBI Fermentas
Restriktionsendonukleasen	MBI-Fermentas
T4 DNA Ligase	Gibco
DNaseI (RNase-frei)	Roche: 776785
Proteinase K	Sigma : P6556
SuperScriptII RNaseH Reverse	
Transkriptase	GibcoBRL : 18064-022
Taq DNA Polymerase	Eppendorf, MBI: EP0282

2.9 Lösungen und Puffer

2.9.1 Bakterienkultur

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

2.9.2 Zellkultur

Ampicillin	Boehringer
FKS (Fötale Kälberserum)	Biochrom
Acrylamid/Bisacrylamid	38+2 Roth
ATV-Lösung	137mM NaCl (= 8 g/l), 5mM KCl (= 0,4 g/l), 5mM D(+)-Glucose (= 1 g/l), 7 mM NaHCO ₃ (= 0,58 g/l), Trypsin(= 0,5 g/l), Versene (= 0,2 g/l)

Antibiotikamix doppel MEM	Penicillin/Streptomycin (je 1g/10 ml) doppelte Menge an MEM Bestandteilen pro Liter
Elutionspuffer (Ak-Säule) FACS-Puffer	0,1 M Glycin-HCl (pH 2,7) 0,4% BSA, 0,02% N ₃ in Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem PBS
Farbpuffer (DNA/RNA) Einfriermedium	50 % Glycerin, 0,4 % Bromphenolblau, 0,4 % Xylencyanol FKS, 10 % DMSO
FACS-Puffer HBSS-Lösung	0,4 % BSA, 0,02 % N ₃ in Ca/Mg-freiem PBS Biochrom KG
Mowiol	2,4 g Mowiol® 4-88 Calbiochem No.475904 6 g Glycerin 2,42 g Tris 0,45 g DABCO Sigma D-2522
Paraformaldehyd Poly-L-Lysin	3,7% Paraformaldehyd in Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem PBS Sigma (Best.-Nr.: P8920)
PBS	138 mM NaCl (= 8 g/l), 2,7 mM KCl (= 0,2 g/l), 6,5 mM Na ₂ HPO ₄ (= 1,15 g/l), 1,5 mM KH ₂ PO ₄ (= 0,2 g/l), 0,9mM CaCl ₂ (= 0,167 g/l), 0,5mM MgCl ₂ , pH 7,4
PBS Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei	PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺

RPMI 1640	GibcoBRL: 51800-043
PBS-T	0,05% Tween 20 (Sigma: P-1379) in PBS pH 7,4

2.9.3 Molekularbiologie

0,1M DTT:	GibcoBRL
5x First Strand buffer	GibcoBRL
10x Taq-Puffer	Eppendorf, MBI
DNA-Puffer TA,	50mM Tris-HCl (pH 8,0), 100 mM ED- 100 mM NaCl, 1% SDS
DNA Marker	Gene Ruler™ 1 kb DNA ladder
Isolutionslösung	50 mM Tris-HCl pH8, 100 mM EDTA 100 mM NaCl, 1 % SDS
Natriumhydrogencarbonat (5,6 %)	56 g/l NaHCO ₃ in a.dest (= 666 mM)
10x DNaseI-Puffer	400 mM Tris-HCl (pH 7,5), 100 mM NaCl, 60 mM MgCl ₂
10x MOPS-Puffer	0,4 M Morpholinopropan- sulfonsäure, 100 mM NaOAc, 10mM EDTA (pH 8,0)
RNA-Gelpuffer	10 % 10x MOPS-Puffer, 17,5 % Formaldehyd (37%), Ethidumbromid
RNA-Probenpuffer	50% Formamid, 15% Formaldehyd (37%) in 10% 10x MOPS-Puffer, 10% 10x Farbpuffer

RNA-Gelelektrophoresepuffer	1x MOPS-Puffer
PCR Beads	Ready-To-Go™ PCR Beads (Amersham)
Phenol/ Chloroform/ Isoamylalkohol	(25 : 24 : 1) Roth
TAE-Gelelektrophoresepuffer	2M Tris-Base, 0,57% Eisessig, 0,6M EDTA

2.9.4 Proteinbiochemie

Entwicklerlösung für Röntgenfilme:	Kodak
Fixierlösung für Röntgenfilme:	Kodak
Protein G Sepharose:	Pharmacia Biotech : 17-0618-01 4 fast flow
Proteinkinase K	Sigma
Proteinbestimmung	
Bicinchoninic acid solution	Sigma: B-9643
Copper (II) sulfate Pentahydrate	Sigma: C-2284
Proteinstandard	1 mg/ml BSA in 0,15M NaCl Sigma: P-0914
Proteinmarker	Benchmark Protein Ladder prestained GibcoBRL: 10748-010
Protein Ladepuffer	Roti-Load1 reduzierend oder Roti-Load2 (nicht reduzierend) Roth: K929,1
Proteaseinhibitor	Roche Diagnostics complete EDTA-free :1873580 1 Tablette pro 50ml Lysepuffer
SDS-Elektrophoresepuffer:	3,03% Tris, 14,4% Glycin, 1% SDS
TAE Puffer	0,4 M Tris-COOCH ₃ , 10 mM EDTA
TE-Puffer	10 mM Tris-Cl pH 8,0, 1 mM EDTA

Tjbl	30 mM KAc, 100 mM RbCl, 10 mM CaCl ₂ ·2 H ₂ O, 150 mM MnCl ₂ ·4H ₂ O, 75 ml Glyzerin auf 500 ml, pH 5,8
TjblI	10 mM MOPS, 75 mM CaCl ₂ ·2H ₂ O, 10 mM RbCl, 15 ml Glyzerin auf 100 ml, pH 6,5
Resuspensionspuffer (Puffer 1)	50 mM TrisCl pH 8,0 , 10mM EDTA, 100 µl RNase
Lysepuffer (Puffer 2)	200 mM NaOH, 1 % SDS
Neutralisationspuffer (Puffer 3)	3 M Potassium Azetat pH 5,5
NP-40 Lysepuffer	125 mM NaCl, 50mM Hepes, 1mM EDTA, 1% NP-40
Waschpuffer (AK-Säule)	20mM NaH ₂ PO ₄ , 20mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4)
Western Blott Puffer 1 (WB1)	0,3 M Tris HCl pH 10,4 (36,33g/l) 20% Methanol
Western Blott Puffer 2 (WB2)	0,025 M Tris HCl pH 7,4 (3,03g/l) 20% Methanol
Western Blott Puffer 3 (WB3)	0,040 M Aminocaprossäure (Hexansäure; 5,25 g/l) 0,025 M Tris HCl pH 10,4 (36,33g/l) 20% Methanol
Blocking Puffer	5% Magermilchpulver (Saliter 1g Fett/100g) 0,05% Tween 20 (Sigma: P-1379) in PBS pH 7,4

2.10 Kits

EndoFree Plasmid MaxiKit	Qiagen
Large cell separation column	Miltanyi Biotec
Plasmid Spin Mini Kit	Sigma
Mouse Mab isotyping test kit	HyCult biotech Bv: L2020
Mammalian total RNA kit	Sigma
RNeasy Minikit	Qiagen

2.11 Verbrauchsmaterial

Dialyseschläuche	Serva
Einmalküvetten	Eppendorf
Glasküvetten	Pharmacia
Pipettenspitzen	Eppendorf
Plastikartikel für Bakterien-und Zellkultur	Falcon, Greiner, Nunc

2.12 Geräte

Analysewaage	Sartorius
Autoklav	MM, München
Bakterienschüttler	Infors
Brutschränke	Heraeus
FACSanner	Becton-Dickinson
Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Mikroskope	Hund
PCR-Maschine	Perlin Elmer
pH-Meter	WTW
Spektrometer	Pharmacia

Sterilbank

Tischzentrifugen

Vortexer

Waage

Wasserbad

Zählkammern

Zentrifugen

Gelaire

Hettich, Heraeus

Bender + Hobein

Chyo

Köttermann

Thoma

Hettich, Sorvell, Beckmann

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur adhärenter Zellen

Adhärente Zellen wie CHO-, CHO5.3- und Vero-Zellen werden in 250 ml Plastikkulturflaschen mit NaHCO₃-gepuffertem MEM 5 % FKS, Antibiotika und 10 ml/L L-Glutamin (200 mM) im 37 °C-Brutschrank unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert. Nach Erreichen konfluenten Monolayer werden die Zellen mit 2 ml ATV-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:10 auf neue Flaschen verteilt.

B95a-Zellen werden auf die gleiche Art behandelt. Als Nährmedium dient RPMI mit 10 % FKS, Antibiotikum und 10 ml/L L-Glutamin (200 mM).

3.1.2 Zellkultur von Suspensionszellen

Die BJAB-Zellen sowie die persistent infizierten BJAB-Zellen (BJABpEdm-bzw. BJABpWTFb) werden in 250 ml Plastikkulturflaschen im 37 °C Brutschrank mit NaHCO₃-gepuffertem RPMI, 10 % FKS, Antibiotika und 10 ml/L L-Glutamin (200 mM) unter 5 % CO₂-Begasung kultiviert.

Die Zellen in dicht bewachsenen Kulturflaschen werden im Verhältnis 1:5 auf neue Flaschen passagiert.

3.1.3 Isolierung primärer humaner mononukleärer Zellen aus peripherem Blut

Als Quelle für primäre PBMC dienten „Buffy Coats“, die aus Blut gesunder Spender in der Abteilung für Transfusionsmedizin und Immunhämatologie, Universitätsklinik Würzburg hergestellt worden waren. Die „Buffy Coats“ wurden mit einem Volumen Ca²⁺ /Mg²⁺ -freiem PBS verdünnt, auf ein Kissen Ficoll-Paque™ Plus geschichtet und bei Raumtemperatur durch Zentrifugation mit 400 g für 30 min entsprechend der Dichte aufgetrennt. Die PBMC-haltige Interphase wurde abgenommen und mehrmals mit kaltem Ca²⁺ /Mg²⁺ -freiem PBS gewaschen. Entsprechend der weiteren Verwendung wurden die Zellen gezählt und in Ca²⁺ /Mg²⁺ -freiem PBS oder Kulturmedium resuspendiert.

Gegebenenfalls wurden vor der Verwendung Makrophagen und Monozyten entfernt, indem die PBMCs für 2 Stunden in Nährmedium bei 37°C inkubiert wurden. Makrophagen heften sich am Boden der Kulturflasche an. Die peripheren Blut Lymphozyten (PBL) bleiben in Suspension und können so abgetrennt werden.

3.1.4 Kultur von Hybridomzellen zur Antikörpergewinnung

Hybridomzellen werden hergestellt durch die Fusion von B-Zellen der Maus mit immortalisierten Maus-Myelomzellen SP2/0. Hybridomzellen heften nur leicht an der Oberfläche der Kulturgefäße an und lassen sich einfach durch Abspülen von den Gewebekulturflaschen ablösen. Die Hybridomzellen werden in Hybridom-Medium (RPMI 10% FKS) kultiviert. Während der Antikörperproduktion wachsen die Hybridomzellen als dichter Zellrasen und der Kulturüberstand wird beim Splitten der Zellen für die Antikörperaufreinigung entnommen.

3.1.5 Einfrieren und Auftauen von Zellen

$3\text{-}5 \cdot 10^6$ Zellen werden für 10 min mit 1.200 rpm und 4 °C abzentrifugiert und das Zell-Pellet anschließend in kaltes Einfriermedium (FKS, 10 % DMSO) überführt. Das Einfrieren erfolgt schrittweise für zwei Stunden bei -20 °C, über Nacht bei -80 °C, wodurch eine Gefrierate von ca. 1 °C /min bei anschließender Überführung in flüssigen Stickstoff erreicht wird. Zum Auftauen wird die gefrorene Zellsuspension schnell in einem handwarmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in einen zehnfachen Überschuss an kaltem Medium überführt, um das DMSO auszuverdünnen. Anschließend wird wie oben zentrifugiert, das Zellpellet in frischem Medium aufgenommen und in zwei kleine Zellkulturflaschen überführt. Zur Erholung werden die Zellen über Nacht inkubiert. Am nächsten Tag wird das Medium nochmals erneuert, um bereits tote Zellen zu entfernen.

3.1.6 Mycoplasmentest

Um eine Kontamination der Zellkulturen mit Mycoplasmen (zellwandlose, parasitäre Bakterien) zu vermeiden, wird regelmäßig auf Mycoplasmen getestet. Hierzu werden die zu prüfenden Kulturen in Kulturmedium ohne Antibiotika überführt und drei Tage kultiviert. Der Mycoplasmenachweis erfolgt mit einem Mycoplasmen PCR Test-Kit (Stratagene). Kontaminierte Kulturen können über eine Anti-Mycoplasmenkur gereinigt werden. Bei der Eliminierung der Mycoplasmen wird eine Antibiotika-Kombination verwendet, um eine Resistenz-Entwicklung zu verhindern. Dem Kulturmedium wird BM-Cyclin1 (Pleuromutilin-Derivat, 10 µg/ml) für 3 Tage zugesetzt und nach Mediumwechsel wird BM-Cyclin2 (Tetracyclin-Derivat, 5µg/ml) für 4 Tage zugesetzt. Dieser 7-tägige Zyklus wird dreimal wiederholt und im Anschluss an diese Mycoplasmenkur werden die Zellen noch einmal einem PCR Mykoplasmentest unterworfen.

3.1.7 Transiente Transfektion von CHO-Zellen mit Lipofektamine 2000 Transfektionsreagenz

Wenn nicht anders angegeben, werden $1 \cdot 10^5$ Zellen in 2 ml Nährmedium (MEM, 10 % FKS) pro 3,5 mm Kulturschale (oder 6-Napf-Platte) ausgesät. Es wird damit nach 18-24 h eine Konfluenz von 80 - 90 % erreicht.

In einem sterilen Polypropylen Röhrchen werden zu 235 µl serumfreiem Optimem 15 µl Lipofektamine 2000-Transfektionsreagenz (Invitrogen) gegeben, um ein Endvolumen von 250 µl zu erreichen. Um eine Adsorption am Plastikröhrchen zu verhindern, wird das Transfektionsreagenz direkt in das serumfreie Medium getropft und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert.

In einem zweiten Röhrchen werden 5 µg DNA in 250 µl Optimem verdünnt.

Die Verdünnungen werden vereinigt. Zum Mischen des Inhalts wird das Röhrchen leicht angetippt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Transfektion der Zellen wird die Lösung aus serumfreien Medium, DNA und Transfektionsreagenz auf die 2 ml Nährmedium in den Kulturschälchen getropft und durch Schwenken vermischt. Bis zur Analyse werden die Zellen für 24-48 h bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Bei Herstellung stabil transfizierter Zellen werden die Transfektanten nach 24 h mit ATV gelöst und in Selektionsmedium überführt.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 MV-Produktion

Zur Herstellung von MV-Edm werden adhärente Vero-Zellen verwendet. Ein zu 80 % konfluenter Zell-Monolayer wird mit einer MOI = 0,01 in serumfreiem Medium infiziert. Nach einer Inkubation von 60 min bei 37 °C wird das Medium entfernt und die Zellen mit frischem Medium (10 % FKS) bei 33 °C bis zum Erreichen des maximalen CPE (3-5 dpi) kultiviert. Zur Isolation des Virus wird das Medium soweit entfernt, dass der Boden der verwendeten Kulturflasche gerade noch bedeckt ist und die Flasche über Nacht bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag werden die Zellen langsam bei 4 °C aufgetaut und das zellgebundene Virus durch vorsichtiges Hin- und Herpipettieren freigesetzt. Zellrückstände werden durch Zentrifugation für 15 min. bei 3.000 rpm entfernt und der Überstand als Virusvorrat aliquotiert und bei -80 °C gelagert.

3.2.2 Ultrazentrifugation von Virus-Präparationen

Für die Produktion von MV-Vorräten mit hohem Virustiter werden Zellen infiziert, wie zuvor beschrieben. Nach der Ausbildung des maximalen CPEs werden die infizierten Zellen in geringem Volumen über Nacht bei -80°C eingefroren, und anschließend bei 4°C langsam aufgetaut. Zur Freisetzung des zellgebundenen Virus wird das aufgetaute Virus-Zellmaterial in einen Zellhomogenisator auf Eis überführt und mit ca. 5 Schüben homogenisiert, so das Virus durch die Scherkräfte freigesetzt wird. Zelldebris wird durch Zentrifugation bei 4000 rpm für 15 min. und 4°C pelletiert und der Virusüberstand wird in Ultrazentrifugenröhrchen auf 25 %ige Sukrosekissen geschichtet. Die Viren werden dann durch Ultrazentrifugation bei 26.000 rpm für 90 Min. bei 4°C pelletiert und können in entsprechendem Volumen PBS resuspendiert werden. Alle Schritte werden zur Erhaltung einer möglichst hohen Infektiosität des Virus auf Eis durchgeführt.

3.2.3 Bestimmung von Virustitern durch Endpunkttitration

Der Titer des WTFb-Virusvorrats wird auf B95a-Zellen bestimmt, obwohl das Virus auf BJAB-Zellen kultiviert wird. Ursprünglich wird deren Titer durch eine Endpunkttitration auf BJAB-Zellen mit einer anschließenden Auswertung im Durchflusszytometer bestimmt. Parallel angesetzte Experimente zeigen aber keinen Unterschied zwischen direkt auf B95a-Zellen abgelesenen Titern und den im Durchflusszytometer bestimmten Titern.

Für eine Endpunkt-Titration werden zu 50 % konfluente Monolayer von Vero-, bzw. B95a-Zellen mit 1:4 angesetzten Verdünnungsreihen des Virusvorrates in Medium mit 5 % FKS überschichtet und anschließend fünf Tage bei 37 °C inkubiert. Es wird der letzte Napf ausgewertet, in dem das Virus noch zu einer deutlichen Infektion führt. Aus jeweils 3 Ansätzen wird der Mittelwert bestimmt.

3.2.4 TCID₅₀ Test (50 % - Endpunkttitration)

Zur Bestimmung der TCID₅₀/ml 1·10⁵ B95a Zellen in einer 96-well-Zellkulturplatte ausgesät mit 100 µl RPMI (10% FKS). Nach ÜN Inkubation wird das Medium abgenommen. Die Virusverdünnungen werden mit RPMI ohne FKS hergestellt. Je 1 ml Verdünnungen von 10⁻¹ bis 10⁻¹⁰ werden hergestellt, indem 900 µl Medium vorgelegt werden und 100 µl überführt werden. Pro Verdünnungsstufe werden acht Näpfe mit je 100 µl versetzt. Nach 2h Adsorption werden 10 µl FKS zugegeben. Die Anzahl der cpe-positiven Näpfe wird nach 5 Tagen lichtmikroskopisch bestimmt. Die TCID₅₀/ml und der Standardfehler wird entsprechend den Formeln nach Spearman und Kärber berechnet. Die Endpunkttitration wurde für alle Wildtypviren verwendet.

$$\log TCID_{50} = \chi_{p=1} + \frac{1}{2}d - d \sum p$$

Abb. 3-1 Formel zur Berechnung der 50%-Endpunkttitration nach Spearman und Kärber. In der Formel steht $\chi_{p=1}$ für den dekadischen Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch in allen Näpfen der Verdünnung ein CPE zu finden ist. d steht für den dekadischen Logarithmus des Verdünnungsfaktors. p entspricht dem Anteil an CPE-positiven Näpfen pro Verdünnungsstufe. Summe p ist die Summe aller p ab der Verdünnungsstufe $\chi_{p=1}$ und den p -Werten aller höheren Verdünnungen mit beobachtetem CPE. Es wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe berechnet, bei der 50% der Zellen oder Näpfe einen CPE aufweisen.

3.2.5 Virusbindungs-Assay

Adhärente Zellen werden mit PBS (ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$) 1 mM EDTA abgelöst und anschließend einmal in PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Je $2 \cdot 10^6$ Zellen in 100 μl PBS werden bei 4 °C oder 37 °C für eine Stunde mit Virus (Moi=1 bis 10) in FACS-Röhrchen inkubiert. Die pfu der Viruspräparation wird durch Endpunkttitration (**3.2.2**) bestimmt. Anschließend werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit dem mAK anti MV-H L77 und FITC-konjugiertem Kaninchen-anti Maus AK gefärbt und anschließend mit 3,7 % PFA fixiert (Lebendfärbung). Die Menge an gebundenem Virus wird in einem Durchflusssy-tometer bestimmt.

Es wird der Quotient der Mean Fluoreszenzintensität der mit Virus inkubierten Ansätze und der Mean Fluoreszenzintensität der Ansätze ohne Virus gebildet, dieser gibt die relative Virusbindung an.

3.2.6 Infektions-Assay

$5 \cdot 10^4$ der zu testenden Zellen werden in FACS-Röhrchen mit einer Virusmenge zwischen 0,1 und 1 für eine Stunde bei 37°C in möglichst geringem Volumen serumfreien oder serumarmen Nährmedium infiziert. Nach dieser Zeit werden die Zellen gewaschen und für 1-5 Tage in serumhaltigen Nährmedi-um weiterkultiviert. Zur Infektionskontrolle wird eine Immunfluoreszenzfärbung durchgeführt, wobei entweder die Menge an exprimiertem MV-H-Protein an der Zelloberfläche oder internes MV-N-Protein detektiert wird.

3.2.7 Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie

Für die Analyse in der Durchflusszytometrie werden die Zellen durch Inkubation mit $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem HBSS-Medium und 1 mM EDTA von der Oberfläche der Kulturflaschen abgelöst, sorgfältig resuspendiert und gezählt. Bei den Immunfluoreszenzfärbungen für die Durchflusszytometrie werden, falls nicht anders vermerkt, pro Ansatz $1 \cdot 10^5$ Zellen verwendet. Die Färbungen werden in 5 ml FACS-Röhrchen durchgeführt, alle Zentrifugationsschritte in einer Hettich-Zentrifuge bei 1.200 rpm und 4 °C für 10 min. Als "FACS"-Puffer (FP) für die Waschschrte bzw. zur Verdünnung der Antikörper wird Ca/Mg -freies PBS, 0,4 % BSA, 0,02 % NaAzid, pH 7,4 verwendet. Primärantikörper und FITC-markierte Zweitantikörper werden, falls nicht anders vermerkt, 1:100 verdünnt und in einem Volumen von 100 μl für 45 min bei 4 °C mit den Zellen inkubiert. Bei den Lebendfärbungen gegen Oberflächen-Antigene werden die Zellen ohne Fixierung mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert und anschließend zweimal mit je 1 ml FP gewaschen. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper werden die Zellen erneut zweimal gewaschen und für 10 min mit 200 μl 3,7 % PFA (in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS) fixiert.

Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, die durch die Fixierung entstanden sind, werden die Zellen über Nacht mit 2 ml Medium, 10 % FKS inkubiert. Nach zwei abschließenden Waschschrten werden die Zellen in 200 μl FP resuspendiert und in der Durchflusszytometrie analysiert. Für die quantitative Analyse wird ein "Fluorescence activated cell scanner" (FACS) mit Argonlaser (488 nm) und angeschlossenem Hewlett-Packard Computer mit LysisII-Software verwendet. In diesem Gerät ist es mit Hilfe von Laserlicht möglich, Zellen anhand morphologischer Kriterien wie Größe (im "forward scatter" = FSC) und Granularität (im "side-scatter" = SSC) sowie exprimierter Antigene (nach Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen) zu unterscheiden und mit Hilfe der Computer-Software zu analysieren.

3.2.8 Immunfluoreszenzfärbung in Chamber Slides

Pro Kammer eines 8-Kammer Chamber Slides werden ca. $5 \cdot 10^4$ Zellen ausgesät. Die Zellen werden mindestens 12 h bei 37°C inkubiert, um eine ausreichende Haftung zu erreichen. Danach werden die Zellen entweder mit MV infiziert oder direkt mit Antikörper gefärbt. Dazu wird das Nährmedium abgesaugt und die Zellen für 7 Min mit 200 µl PFA 3,7% auf Eis fixiert. Gegebenenfalls werden die Zellen anschließend mit 200 µl Permeabilisationspuffer behandelt.

Nach zweimaligem waschen mit 400 µl PBS sollten die Zellen für mind. 45 Min mit Nährmedium (10% FKS) inkubiert werden, um unspezifische Bindung durch PFA zu verhindern.

Nach wiederholtem Waschen mit PBS wird der 1. Antikörper in entsprechender Verdünnung (F227 aMV-N → 1:100) zugegeben und auf 45 Min auf Eis inkubiert. Nach zweifachem Waschen wird dann der entsprechende 2. Antikörper (Alexa 488 antiMaus Ig → 1:400) zugegeben .

Nach erneutem Waschen wird der Waschpuffer abgesaugt und das Chamber Slide kurz angetrocknet, der Kammeraufsatz entfernt und die Zellen mit wenigen Tropfen Mowiol (**3.2.12**) und einem Deckglas abgedeckt. Um eine Austrocknung zu verhindern, kann das Deckglas mit Nagellack fixiert werden.

Bei Färbung von lebenden Zellen wird bis auf die Fixierung und Permeabilisierung der Zellen auf die gleiche Weise verfahren. Die Auswertung erfolgt im Fluoreszenzmikroskop.

3.2.9 Magnetische Selektion von Zellen

Die Zellen werden bei 1.200 rpm im Blaudeckelröhrchen abzentrifugiert und mit 5 ml MACS-Puffer gewaschen. Für die Markierung mit dem Erstantikörper (anti-CD150) werden 2 µl Antikörper pro $2 \cdot 10^5$ Zellen (bei einer Gesamtzellzahl von bis zu $3 \cdot 10^7$) in 1-2 ml MACS-Puffer verdünnt und für 30 min auf Eis inkubiert. Nach zweimaligem Waschen mit 3 ml MACS-Puffer werden die Zellen in 80 µl Puffer pro 10^7 Zellen aufgenommen. Zu der Lösung werden pro 10^7 Zellen 20 µl magnetische anti IgG1 Micro-Beads (MiltenyiBiotec) gegeben und nach kurzem Mischen für 15 min bei 6-12 °C inkubiert. Für die Sortierung über die Magnetsäule werden die Zellen zweimalig mit 3 ml MACS-Puffer gewaschen und in 500 µl Puffer pro 10^8 Zellen aufgenommen.

Die Magnetsäule wird in den Magneten eingehängt und mit 500 µl entgastem MACS-Puffer equilibriert. Die Zellen werden anschließend auf die Säule gegeben. Die Durchflussgeschwindigkeit wird durch die Gravitation bestimmt. Nach dreimaligem Waschen mit 500 µl Puffer bleiben nur die positiven Zellen an der Magnetsäule haften. Die Säule wird daraufhin dem Magneten entnommen und der Flow-Resistor entfernt. Die positiven Zellen werden mit 1 ml Puffer in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

3.2.10 Infektion mit pFB-Luc (Luciferase) retroviralem Überstand

Pro Napf einer 6-well-Platte werden $5 \cdot 10^4$ Zellen werden ausgesät und bis ca. 60 % Konfluenz kultiviert. Die retroviralen Luciferase Viren werden in Zehnerschritten von 1:10 bis 1:10⁷ mit Medium + DEAE-Dextran (10mg/ml) 1:1000 verdünnt. 1 ml der Virusverdünnung wird zu den Zellen gegeben. Zur Kontrolle 1 ml Medium ohne Virus. Die Zellen werden 3 Std. bei 37 °C inkubiert, danach wird 1 ml Medium (10% FKS) zugegeben und für weitere 48 Std. bei 37°C inkubiert. Zur Messung der Luciferaseaktivität wird das Nährmedium abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend werden die Zellen mit 400 µl/well mit Lysepuffer (Promega) bedeckt. Die Zellen werden abgeschabt und jeweils 20 µl in eine 96-well-Platte zur Analyse gegeben.

Einstellung:

10 sec Messung, 2 sec Verzögerung

100 µl Luciferasemix (Promega)

10 Hübe

3.2.11 Zellsortierung im FACS-Sorter

Um maximale Sterilität zu erreichen, sollten sterile FACS-Röhrchen und Einmalpipetten verwendet, sowie die Antikörper vor Gebrauch sterilfiltriert werden. Als Puffer dient PBS mit 2 % FKS.

Die zu sortierenden Zellen werden mit HBSS EDTA (1 mM) bei 37°C abgelöst und einmalig mit Puffer gewaschen.

Pro $1 \cdot 10^6$ Zellen werden sowohl erster als auch zweiter AK in 200 μ l Puffer 1:40 verdünnt. Die Inkubationszeit pro AK beträgt ca. 45 min. Zwischen den Färbeschritten werden die Zellen zweimal mit Puffer gewaschen.

Nach der Sortierung werden die Zellen 3 mal mit Nährmedium gewaschen und wieder in Kulturflaschen ausgesät. In Nährmedium + 3fache Menge Antibiotikum zur Vorbeugung von Bakterienkontamination sowie gegebenenfalls Amphotericin B zur Vorbeugung von Hefekontamination können die sortierten Zellen weiter kultiviert werden.

3.2.12 Herstellung von Mowiol®

In einem Erlenmeyerkolben werden zu 2,4 g Mowiol® (Calbiochem No.475904) und 6 g (4,9 ml) Glycerin, 6 ml aqua dest. unter Rühren zugegeben. Die Lösung wird für 2 Std. bei RT unter Rühren inkubiert.

2,42 g Tris werden in 80 ml aqua dest. gelöst und mit 1 M HCl-Maßlösung auf pH 8,5 eingestellt, dann mit aqua dest. auf 100 ml aufgefüllt. 12 ml der Tris/HCl Lösung werden zum Ansatz unter Rühren hinzugegeben und für 10-20 min auf dem Heizrührer bei 50°C gelöst. Die ungelösten Bestandteile werden dann bei ca. 1500 g abzentrifugiert und in ein 50 ml Röhrchen überführt. In 18 ml werden 0,45 g DABCO hinzugefügt und bei 37°C kurz gelöst. Die fertige Lösung wird aliquotiert und bei -20°C gelagert.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Plasmid Restriktion

Für die Restriktion von Plasmiden werden diese mittels Restriktionsendonukleasen, während 90 min Inkubation im 37 °C Wasserbad geschnitten.

Wenn nicht anders angegeben:

1 µg Plasmid
2 µl Restriktionspuffer
5 U Enzym
H₂O ad 20 µl

3.3.2 Dephosphorylierung des Plasmidvektors

Um eine Religation des Vektors zu verhindern, wird der restriktionsverdaute Vektor mittels „calf intestine phosphatase“ (CIP) in 50 µl-Reaktionen für 30 min bei 37 °C dephosphoryliert:

20 µl restriktionsverdautes Plasmid
5 µl CIP-Puffer
10 U CIP
24 µl H₂O

Die Enzymaktivität wird anschließend durch 15 min Inkubation bei 85 °C zerstört.

3.3.3 Ligation

Zur Ligation der kohäsiven Enden des Genfragmentes und des dephosphorylierten Vektors wird Vektor und Fragment im molaren Verhältnis von 1:3 eingesetzt und mit T4-DNA Ligase (Gibco) 3,5 h bei Raumtemperatur ligiert.

1 µl Vektor (60 fmol)
4 µl Fragment (20 fmol)
4 µl Ligationspuffer
1 µl T4-DNA Ligase
10 µl H₂O

3.3.4 DNA-Sequenzierung mit Rhodamin und dRhodamin-Terminatoren

Zur Sequenzierung von DNA Fragmenten werden 500 ng DNA eingesetzt. Dazu kommen 70 ng Primer und 7.5 µl H₂O und 2.5 µl Taq-Seq-Mix. Zur Vermischung wird die Lösung kurz zentrifugiert (+1 Tr. Mineralöl bei PCR-Geräten mit ungeheiztem Deckel)

im Thermocycler:

25 Zyklen: 30'' 96 °C
 15'' 50 °C
 4' 60 °C

bzw. (9600): 10'' 96°C
 5'' 50°C
 4' 60°C

bei Raumtemperatur, im 1.5 ml Gefäß:

10 µl Seq-Ansatz
+ 90 µl H₂O
+ 10 µl 3M Natriumacetat pH 5.2
+ 250 µl EtOH (RT, nicht aus dem -20°C-Fach)

mischen, 20` 14000 rpm

Pellet 2x mit 70% EtOH (RT) waschen

Pellet trocknen (nicht "übertrocknen!")

Pellet in 15 µl TSR aufnehmen

2` 94 °C

auf Eis

Die DNA-Sequenz wird dann im Sequenzierer ermittelt. Die Sequenzvergleiche wurden mit DNA-Star Software durchgeführt.

3.3.5 Reverse Transkription

Über Reverse Transkription wird Virus RNA bzw. genomische RNA in cDNA umgeschrieben, die dann in der PCR als Template umgesetzt werden kann. Unter Verwendung von oligo(dT)₁₅-Primern, die sich an das polyadenylierte Ende der mRNAs anlagern, sowie Reverser Transkriptase (SuperSkript-II™ von GibcoBRL) wird die RNA in cDNA umgeschrieben.

Der Reaktionsansatz setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1 ng – 5µg totaler RNA

1 µl oligo(dT)₁₅-Primer

1 µl dNTP-Mix,

dieser Ansatz wird mit sterilem a.dest auf 13 µl aufgefüllt, 5 min. auf 65°C zur Strangtrennung erhitzt und schnell auf Eis abgekühlt, dann werden

4 µl 5x RT-Puffer

2 µl 0,1M Dithiothreitol (DTT)

zugefügt, gemischt, kurz zentrifugiert und für 2 min. bei 42°C temperiert. Zu diesem Reaktionsansatz wird dann 1µl der Reversen Transkriptase zugefügt, erneut gemischt und für 50 min. bei 42°C inkubiert. Das Enzym wird durch Erhitzen auf 70°C für 15 min. inaktiviert.

Im Anschluss an die Reverse Transkription wird mit dieser generierten cDNA PCR durchgeführt.

3.3.6 Polymerase-Ketten-Reaktion

Die Polymerase-Ketten-Reaktion (PCR- polymerase chain reaction) nach Saiki et al., 1988 ist eine *in vitro* Methode zur Amplifikation von DNA-Strängen. Bei der Methode wird die Eigenschaft der DNA-Polymerase ausgenutzt, einen Einzelstrang mit Hilfe von kurzen doppelsträngigen Bereichen generieren zu können. Das allgemeine Prinzip besteht darin, dass man Nukleinsäuren mit der zu amplifizierenden Sequenz mit einem Überschuss an chemisch synthetisierten Primern, freien Nukleotiden und der DNA-Polymerase versetzt, und dass eine Polymerase-Reaktion stattfindet. Die Primer sind homolog zu den Randbereichen der zu amplifizierenden Sequenz. Die Methode läuft prinzipiell in 3 sich wiederholenden Schritten ab. Im ersten Schritt (Denaturierung) wird die Template-DNA durch Erhitzen auf 95°C denaturiert. Im zweiten Schritt (Annealing) lagern sich die Primer an die homologen Bereiche. Im dritten Schritt (Extension) erfolgt dann die Kettenverlängerung durch die DNA-Polymerase. Das Produkt dieser Reaktion ist ein doppelsträngiges DNA-Fragment, dessen Enden durch die 5'-Enden der Primer vorbestimmt sind und dessen Länge durch die Distanz der Primer zueinander festgelegt ist.

Der allgemeine Zyklus sieht wie folgt aus:

Vorabdenaturierung	95°C	2 min	1 x
Denaturierung	95°C	1 min	} 32 Zyklen
Annealing	x°C	1 min	
Extension	72°C	y min	
Endextension	72°C	7 min	1x

x°C richtet sich nach der Schmelztemperatur der Primer und der Stringenz der PCR.

y min richtet sich nach der Länge des zu amplifizierenden Fragments, als Richtwert gilt 1 min pro 1000 bp.

Der Reaktionsansatz für die PCR setzt sich wie folgt zusammen:

100 ng – 1 µg DNA

5 µl 10x Taq-Puffer

5 µl dNTP-Mix

2,5 µl 25mM MgCl₂

50pM "upper primer"

50pM "lower primer"

0,5 µl Taq-Polymerase

Ansatz mit sterilem a.dest auf ein Volumen von 50 µl auffüllen.

Die Ansätze werden gemischt, kurz zentrifugiert und falls erforderlich, bei Benutzung einer PCR Maschine ohne beheizbaren Deckel, mit einem Tropfen Mineralöl überschichtet.

Außerdem werden in dieser Arbeit Ready-To-Go™ PCR Beads verwendet. Diese Kügelchen beinhalten alle notwendigen Reagenzien außer Primer und Template-DNA zur Herstellung einer 25 µl PCR-Amplifikationsreaktion (genaue Angaben siehe Produktbeschreibung der Ready-To-Go™ PCR Beads von Amersham).

3.3.7 Herstellung kompetenter Bakterien

1 ml *E.coli* Dh5α einer 5 ml Übernachtskultur werden mit 100 ml LB-Medium für 2-3 Stunden bis zu einer OD₆₀₀ von 0,2 - 0,3 inkubiert.

Nach 5 min Abkühlung auf Eis werden die Bakterien 10 min bei 2500 rpm abzentrifugiert. Das Bakterienpellet wird mit 40 ml Tjbl-Puffer resuspendiert und erneut für 10 min bei 3.000 U/min in der Tischzentrifuge bei 4 °C zentrifugiert. Das Bakterienpellet wird mit 4 ml Tjbl resuspendiert und für 5 min auf Eis inkubiert. Die Bakterienlösung wird anschließend in Kryoröhrchen aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -80 °C gelagert.

3.3.8 Transformation von Bakterien

100 µl kompetente Bakterien (*E.coli*) werden mit 0,1 µg Plasmid-DNA 30 min auf Eis inkubiert. Nach einem Hitzeschock von 90 sek bei 42 °C im Wasserbad wird die Reaktion für weitere 90 sek auf Eis abgekühlt und nach Zugabe von 1 ml LB-Medium für 45 min bei 37 °C inkubiert. Nach dem Abzentrifugieren der Bakterien über 5 min bei 6.000 rpm wird das Bakterienpellet in 80 µl LB-Medium resuspendiert und auf LB-Agarplatten mit Ampicillin ausplattiert. Die Agarplatten werden im Bakterienbrutschrank über Nacht bei 37 °C inkubiert.

3.3.9 Isolation extrachromosomaler DNA aus Bakterien (Maxi-Präparation)

Zur Isolation extrachromosomaler DNA aus Bakterien wird das EndoFree Plasmid MaxiKit (Qiagen) verwendet. Zur Präparation wird eine Bakterienkultur in 150 ml LB/Ampicillin angesetzt. Bei einer OD_{600} von ca. 0,8 werden die Zellen 15 min mit 6.000 rpm abzentrifugiert und das Bakterienpellet in 10 ml Resuspensionspuffer P1 aufgenommen. Zur Lysierung der Bakterien wird Lysepuffer P2 zugegeben und für maximal 5 min bei RT inkubiert. Nach Zugabe von 10 ml Neutralisationspuffer (P3) und mehrmaligem Invertieren der Lösung, wird diese in der entsprechenden Säule für 10 min bei RT inkubiert. Durch Pressen durch die Säulenmembran wird die Lösung von festen Bestandteilen befreit. Zur Entfernung von Endotoxinen werden 2,5 ml (etwa 1/10 der Lösung) eines Endotoxinentfernungspuffers dazugegeben und für 30 min auf Eis inkubiert.

Danach wird die Lösung auf eine zweite Säule gegeben, die mit 10 ml Puffer QBT equilibriert wird und tropft durch Gravitationskraft durch die Membran. In der Membran bleibt nur die Plasmid-DNA zurück, die nach zweimaligem Waschen, wird mit 15 ml Eluierungspuffer F3 eluiert. Zur Fällung der DNA werden 10,5 ml Isopropanol hinzugefügt und sofort bei 11.000 rpm zentrifugiert. Nach einem Waschschrift mit 2,5 ml 70 %igem Ethanol und Zentrifugation wird die getrocknete DNA in 200-300 μ l TE-Puffer aufgenommen. Maximal können so 500 μ g Plasmid-DNA gewonnen werden.

3.3.10 Isolation genomischer DNA aus eukaryotischen Zellen

$2 \cdot 10^6$ Zellen werden in einem 1,5 ml Eppendorf Cap bei 1200 rpm abzentrifugiert. Anschließend werden die Zellen in 700 μ l DNA-Isolutionslösung und 35 μ l Proteinase K (10 mg/ml) aufgenommen. Das Lysat wird für 3,5 Std. bei 56°C inkubiert. Während der Inkubationszeit wird das Lysat mehrfach gevortext. Nach der Inkubation wird das Lysat nochmal für 5 min gevortext. Danach werden 250 μ l gesättigte NaCl-Lösung (ca. 6M) zugegeben und nochmals für 5 min gevortext.

Die gefällten Proteine werden daraufhin 10 min bei 13.000 rpm abzentrifugiert und die 750 μ l Überstand in ein neues Cap überführt. Zum Fälln der DNA wird die Lösung mit 500 μ l Isopropanol 2 min gemischt und anschließend für 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und verworfen. Das DNA-Pellet wird mit 70 %igem EtOH gewaschen und in 10 mM Tris oder H₂O aufgenommen. Die DNA wird bei 37°C während 2 Std. gelöst.

3.3.11 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

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

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

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

Der Grad der Verunreinigung durch Proteine kann durch Messung der Extinktion bei 280 nm festgestellt werden. Das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ gibt den Reinheitsgrad der Nukleinsäure wieder. Saubere RNA-Präparationen besitzen einen Quotienten von 2,0, saubere DNA-Präparationen von 1,8. Für die Messungen werden 5 μl der Nukleinsäurelösung mit a.dest auf 100 μl aufgefüllt und in speziellen UV-Vetten™ von Eppendorf vermessen. Alternativ können bei Verwendung größerer Flüssigkeitsmengen auch Quarzküvetten verwendet werden. Mit dem BioPhotometer der Firma Eppendorf können Messungen der Nukleinsäurekonzentration in speziellen Plasikküvetten durchgeführt werden, und nach Eingabe entsprechender Parameter kann der Reinheitsgrad direkt abgelesen werden.

3.3.12 DNA und RNA Gelelektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese nach Sambrook et al., 1989 ist eine Methode zur Trennung geladener Moleküle im einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit im Gel. Kleine Fragmente der negativ geladenen DNA wandert in der elektrisch neutralen Gelmatrix (Agarose) schneller in Richtung Katode. Agarosegele werden zur Kontrolle von DNA- und RNA-Präparationen und zur Dokumentation von PCR-Amplifikationen und PCR-Produkten angefertigt. Dazu wird für den Nachweis von DNA Agarose in einer Konzentration von 1% in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle für 2 Min. gekocht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C und Zugabe einer Ethidiumbromidlösung zu einer Endkonzentration von 1 $\mu\text{g/ml}$ wird die Agarose-Lösung in einen Gelträger gegossen und ein entsprechender Kamm zur Erzeugung der Auftragstaschen eingesetzt. Nach Polymerisation des Agarosegels wird der Gelträger in die Elektrophoreseapparatur mit Elektrophorese-Puffer (1x TAE) eingesetzt und der Kamm aus dem Gel gezogen. Das Gel wird mit den DNA-Proben, die zuvor mit 1/10 Vol. Farbpuffer versehen wurden, beladen. Nach dem Elektrophoreselauf bei 1,2 V/cm², werden die entsprechend ihrer Größe aufgetrennten DNA-Moleküle im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert. Zum Nachweis von RNA wird die Agarose in einer Konzentration

von 1 % in a.dest aufgekocht, auf ca. 50 °C abkühlen lassen, und dann werden die übrigen Lösungen des RNA-Gelpuffer zugegeben. Die weitere Vorgehensweise gleicht der DNA-Gelelektrophorese, jedoch dient als Elektrophoresepuffer 1x MOPS-Puffer.

3.4 Proteinspezifische Methoden

3.4.1 Reinigung von monoklonalen Antikörpern

Die Zellkulturüberstände von Antikörper produzierenden Hybridomzellkulturen werden bei 4 °C gesammelt. Ist ein Überstandsvolumen von mindestens 500 ml erreicht, werden die antikörperhaltigen Überstände abzentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen und anschließend steril-filtriert (Porengröße 0,2µm), um kleinste Partikel zu entfernen, die später die antikörperbindende Säule verstopfen könnten. Die antikörperhaltigen Überstände werden anschließend über eine Protein G Säule gepumpt. Die Immunglobuline binden an das Protein G und werden so aus dem Überstand entfernt. Über die Säule wird dann ein Waschpuffer gepumpt und anschließend werden die gebundenen Antikörper mit einem sauren Elutionspuffer (pH-Wert 2,7) von der Säule eluiert, und in Röhrchen mit je 0,5 ml vorgelegter basischer 1M Tris-Lösung (pH-Wert 11) aufgefangen und sofort gemischt, um den sauren pH-Wert sofort zu neutralisieren. ÜN wird gegen fünf Liter PBS dialysiert und die AK anschließend portioniert und bei -20°C gelagert.

3.4.2 Immunpräzipitation

In der Immunpräzipitation werden Proteine aus einem Zell-Lysat über einen Antikörper mittels Sepharose gefällt. Dabei bindet der Antikörper das spezifische Protein. Der Antikörper wird mit Sepharose komplexiert und ausgefällt. Sepharose bindet die Fc-Enden des Antikörpers. Für den 5C6 IgG Antikörper wird Protein G Sepharose verwendet.

Hierzu wurden $5 \cdot 10^6$ Zellen mit NP40-Lysepuffer für 20 min auf Eis inkubiert. Verbleibende Zellbestandteile werden daraufhin bei 13.000 rpm über 15 min bei 4°C abzentrifugiert. 250 µg der Proteine im Überstand werden mit 35 µl Protein-G Sepharose (IgG spezifisch) und 2 µg AK für mind. 1 Std. bei 4°C rotiert.

Der Sepharose-Protein Komplex wird anschließend 3-5x mit Lysepuffer gewaschen. Bei Co-Immunpräzipitationen sollte zum waschen PBS verwendet werden. Zwischen den Waschschritten wird der Komplex bei 13.000 rpm über 1 min bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen.

Anschließend wird der Komplex mit 20-25 µl Proteinprobenpuffer für 5 min bei 95°C aufgeköcht und nach kurzem Abzentrifugieren der Sepharose auf ein Polyacrylamidgel aufgetragen.

Nach dem Blotten des Gels werden die gewünschten Proteine mit dem 1. AK sowie Peroxidase konjugiertem 2. AK markiert und auf Fotofilm übertragen.

3.4.3 Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE)

Die Polyacrylamid-Gelelektrophorese (PAGE) dient zur Auftrennung von Proteinen nach ihrer Größe. Wenn nicht anders beschrieben wurden 10%ige Gele verwendet.

Trenngel:

Acylamid/ Bisacrylamid	6,6 ml
Tris pH 8,8	7,5 ml
H ₂ O	5,6 ml
SDS 10 %	0,2 ml
200 µl APS (20 %)	0,2 ml
TEMED	50 µl

Das Gel wird nach dem Gießen in einer entsprechenden Gelkammer mit ca. 1ml Wasser vorsichtig überschichtet und polymerisiert für ca. 30 min. Danach wird das Wasser gründlich abgenommen und das Trenngel mit Sammelgel überschichtet.

Sammelgel:

Acylamid/ Bisacrylamid	1,25 ml
Tris pH 6,8	1,25 ml
H ₂ O	7,4 ml
SDS 10 %	0,1 ml
200 µl APS (20 %)	50 µl
TEMED	20 µl

Nach dem Gießen wird der Kamm eingesteckt und für 30 min polymerisiert. Die Gelkammer wird mit Proteingel-Laufpuffer aufgefüllt und der Kamm entfernt. Die Taschen werden mit Laufpuffer ausgespült.

Die Proteine werden mit 3/4 Vol Probenpuffer (Roti-Load 1) versetzt und 5 min bei 95°C aufgekocht. Die Proteine sowie entsprechende Protein-Größenmarker werden daraufhin in die Geltaschen gegeben. Bei 30-40 mA werden die Proteine aufgetrennt.

3.4.4 Proteinauftrennung im Dichtegradienten (nach *Didio et al.*)

Die Zellen werden in einem 100 mm Kulturschale kultiviert und gegebenenfalls mit MV infiziert. Nach Waschen mit PBS werden die Zellen mit 2 ml Natriumkarbonat (500 mM) pH 11 abgeschabt.

Zum Auftrennen der Proteine werden die Zellen mit 10 Schlägen im Homogenisator homogenisiert und anschließend mit Ultraschall (20s Beschallungen) behandelt.

Die 2 ml der Zellsuspension werden mit 85 % Sucrose (in MBS: 25mM MES pH6,5 + 150 mM NaCl) vermischt. Das Zell-Sucrose Gemisch wird auf den Boden eines Ultrazentrifugenröhrchens gelegt (SW40). Zur Ausbildung des Gradienten werden 5 ml 30 %ige Sucrose und darauf 3 ml 5 %ige Sucrose (in MBS+250mM Natriumkarbonat) gelegt. Zentrifugiert wird für 18 h bei 35.000 rpm (Rotor: SW40ti).

Nach der Zentrifugation werden von den 12 ml der Gradientenzentrifugation jeweils 1 ml Fraktionen durch pipettieren abgenommen und über Dot-Blot analysiert.

3.4.5 Western-Blot

Der Western-Blot nach Towbin *et al.*, 1979 ist allgemein eine Methode, um einzelne Proteine mit spezifischen Antikörpern aus einem Proteingemisch nachzuweisen. Hierzu werden die durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran übertragen, wobei das Proteinmuster und die Immunaktivität der Proteine erhalten bleiben. Deshalb bezeichnet man dieses Verfahren auch als Immuno-Blotting. Die Übertragung der Proteine erfolgt mit einer semitrockenen „Blottingapparatur“ nach Anlegen eines Stromflusses zwischen Anode und Kathode.

Der Aufbau der Transfereinheit sieht wie folgt aus:

Kathode (oben)

vier 3MM-Papiere, getränkt mit WBIII

Polyacrylamidamidgel, äquilibriert in WBIII

Nitrozellulosemembran, äquilibriert in WBII

zwei 3MM-Papiere, getränkt mit WBII

drei 3MM-Papiere, getränkt mit WBI

Anode (unten)

Beim Aufbau der Blotting-Einheit ist darauf zu achten, dass alle Schichten luftblasenfrei aufeinander liegen. Der Transfer der Proteine vom Gel auf die Membran erfolgt bei unbegrenzter Spannung und einer Stromstärke von 140 mA für eine Stunde.

Nach Beendigung des Proteintransfers werden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrozellulosemembran mit Blockingpuffer bei 4 °C ÜN blockiert. Alle weiteren Inkubations- und Waschschriffe erfolgen auf einem Schüttler bei RT. Der Immunonachweis der MV- H-Proteine oder des CD46 auf der Nitrozellulosemembran erfolgt mittels der spezifischen Antikörper. Die AK-Verdünnungen (1:100) werden in Blockingpuffer angesetzt. Nach 2 Stunden Inkubation wird die Membran dreimal 10 min. mit PBST gewaschen. Der Primärantikörper-Nachweis erfolgt durch eine Inkubation der Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 45 min anti-Maus-POX (1:1000). Nach weiteren Waschschriffen, dreimal mit PBST und einmal mit PBS, werden mittels des ECL™-Systems von Amersham die Proteine nachgewiesen. Die Meerrettichperoxidase setzt dabei ein Substrat um, wobei ein Röntgenfilm an der Stelle der spezifisch markierten Proteinbanden über die dabei erfolgende Freisetzung von Photonen geschwärzt wird.

3.4.6 Dot-Blot

Eine Nitrozellulose-Membran wird mit PBS befeuchtet und in eine Dot-Blott Aparatur eingespannt. Die Membran wird einmalig mit 100 µl PBS gewaschen. Je 20 µl pro Fraktion aus der Dichtegradientenzentrifugation (**3.4.6**) werden in eine Kammer gefüllt und anschließend Vakuum angelegt wodurch die Lösung durch die Membran gesaugt wird. Die Proteine bleiben in der Membran haften. Die Membran wird entnommen und entsprechend einer normalen Western-Blot Färbung (**3.4.5**) behandelt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung des monoklonalen Antikörpers 5C6

4.1.1 Isotypbestimmung des monoklonalen Antikörpers 5C6

Zur genauen Charakterisierung des Antikörpers wurde eine Isotypbestimmung durchgeführt. 500 µl Antikörper Überstand aus der mAK 5C6-Hybridomkultur wurden mit 500 µl Puffer (Isotyp-Testkit) und 1 ml Ratte anti-Maus κ-Konjugat für 1 Std. bei RT mit einem Antikörperteststreifen geschüttelt. Zur Kontrolle wurde zusätzlich λ-Kette Konjugat zugegeben.

Nach der Färbung des Teststreifens konnte der mAK 5C6 eindeutig als IgG1-κ Antikörper identifiziert werden.

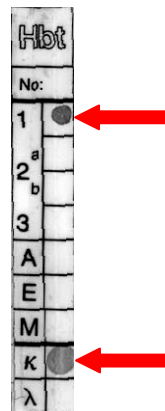


Abb. 4-1: Isotypbestimmung des mAK 5C6. Bei dem mAK 5C6 handelt es sich um einen IgG1-κ Antikörper (Pfeile).

4.1.2 Inhibition der WTFb-Bindung an B95a Zellen durch mAK 5C6

Über FACS-Analyse wurde der Einfluss des mAK 5C6 auf MV-Bindung getestet. $5 \cdot 10^4$ Zellen wurden mit den Antikörpern 10/88, 5C6 oder einer Kombination aus beiden Antikörpern mit einer Konzentration von 0 bis 50 $\mu\text{g/ml}$ inkubiert. Der Antikörper 10/88 erkennt die SCR-Domäne 3/4 von CD46, dem auf B95a Zellen die erste Domäne fehlt. Nach Antikörper Zugabe wurden die Zellen mit WTFb oder Edm (MOI =2,5) für eine Stunde bei 37 °C inkubiert und nicht gebundenes Virus anschließend abgewaschen (Virusbindungsassay 3.2.5). **Abb. 4-2** zeigt die relative Bindung nach Abzug des Hintergrundes sowie die daraus resultierende prozentuale Inhibition der Virusbindung.

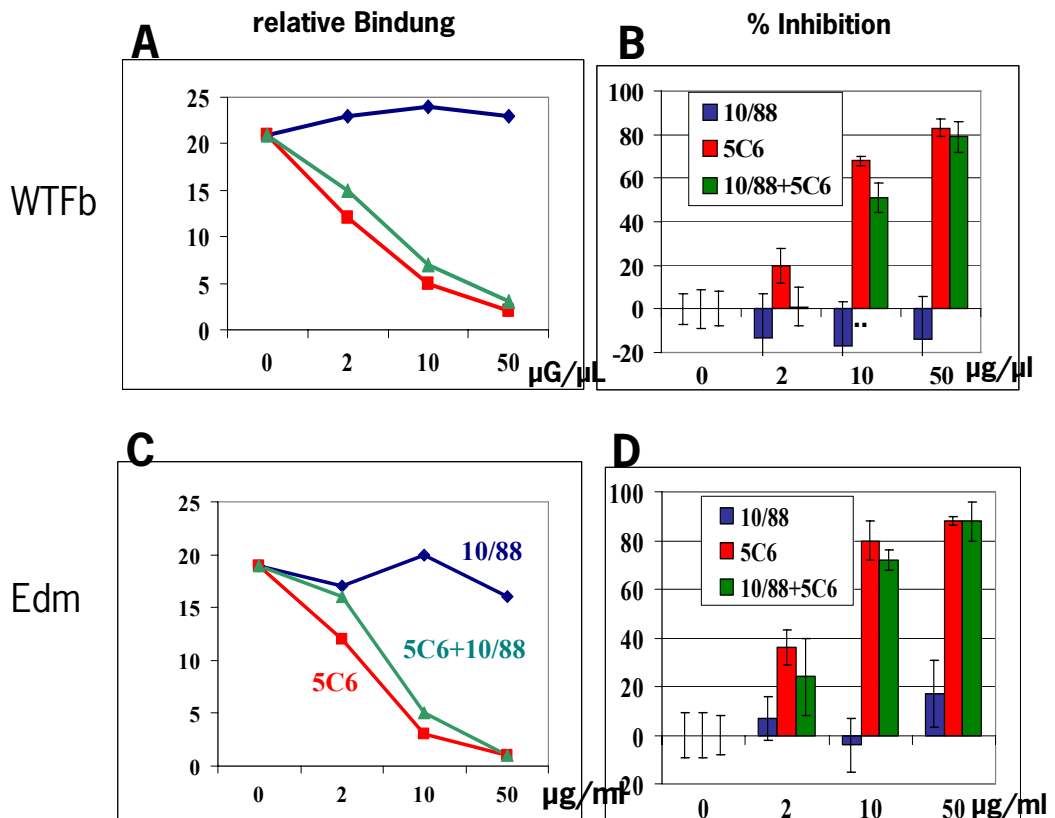


Abb. 4-2 Bindungsinhibition des mAK 5C6 auf B95a-Zellen. $5 \cdot 10^4$ B95a Zellen wurden mit den Antikörpern 5C6 und/oder 10/88 in Konzentrationen von 0-50 $\mu\text{g/ml}$ vorinkubiert und anschließend die Virusbindung von WTFb und Edm bestimmt. Angegeben sind die relative Bindung von WTFb (A) und Edm (C) sowie die prozentuale Inhibition von WTFb (B) und Edm (D) aus drei unabhängigen Versuchen. Die Fehlerbalken zeigen die entsprechende Standardabweichung.

Die Inkubation mit Antikörper 10/88 hat keinen Effekt auf die Virusbindung. Weder die Bindung mit Edm noch die mit WTFb werden beeinflusst. Nach Inkubation mit mAK 5C6 zeigt sich dagegen eine deutliche Inhibition der Virusbindung. Mit steigender Antikörpermenge sinkt die Bindung von WTFb an die verwendete Zelllinie (**Abb. 4-2 A,B**). Ein leichter Effekt ist bereits bei einer Antikörperkonzentration von 2 µg/ml zu erkennen. Bei 10 µg/ml wird die Bindung bereits um ca. 60 % gehemmt. Bei Inkubation mit 50 µg/ml kann die Bindung um über 80 % inhibiert werden. Es zeigt sich auch, dass die Verwendung beider Antikörper in Kombination keinen verstärkenden Effekt erzeugt.

Einen ähnlichen Verlauf zeigt die Bindungsinhibition des Edm Virusstammes (**Abb. 4-2 C,D**) ca. 20 % Inhibition mit 2 µg AK 5C6. 80 % Inhibition mit 10 µg und etwa 90 % der Bindung werden mit 50 µg/ml Antikörper inhibiert. Der Antikörper 5C6 hemmt spezifisch die Bindung sowohl des Wildtypstammes als auch des Vakzinestammes. Da B95a Zellen kein CD46 besitzen, das als Bindungs- oder Eintrittsrezeptor dienen kann, muss der Antikörper einen anderen, unbekanntem Rezeptor binden.

4.2 Identifizierung von SLAM (Signaling lymphocytic activation molecule, CD150) als Rezeptor für Masernviren

MAK 5C6 ist in der Lage sowohl die Bindung von Wildtyp- und Vakzinestämmen zu inhibieren, als auch die Infektion von Wildtyp Viren (4.1.2). Wildtyp Viren wie WTFb infizieren Periphere Blut Lymphozyten (PBL). Zudem erkennt der Antikörper 5C6 ein Molekül auf PBL (Abb. 4-13). So war es naheliegend ein Screening einer humanen PBL cDNA Expressionsgenbank (2.5) mit Hilfe des Antikörpers 5C6 durchzuführen. Die cDNA wurde von der Firma Stratagene aus der mRNA von Milzgewebeproben hergestellt. Die Milzen stammen aus fünf Gewebeproben. Bei den Spendern handelte es sich um weibliche und männliche Kaukasier im Alter von 44-70 Jahren. Der geschätzte Virus-Titer beträgt $2 \cdot 10^6$ /ml.

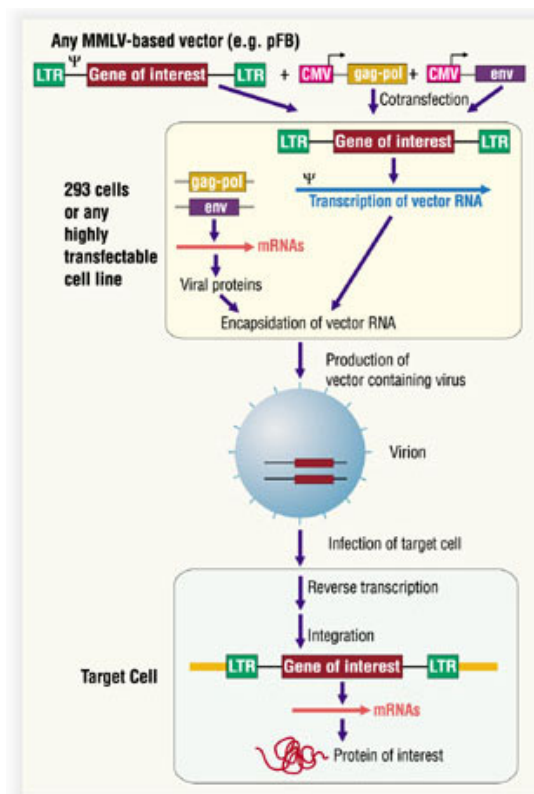


Abb. 4-3 Schema zur retroviralen cDNA Expressionsgenbank (Stratagene)

Wie in **Abb. 4-3** dargestellt, wurden die Genbank cDNA Fragmente kotransfiziert mit gag und pol Proteinen sowie env Protein des MMLV. Nach der Transfektion werden innerhalb der Zielzelle die viralen Proteine gebildet. Die integrierte DNA wird enkapsidiert, wodurch Viren freigesetzt werden, die die gewünschten Vektoren enthalten.

Für diese Arbeit wurden die freigesetzten Überstandsviren verwendet um Zielzellen (CHO Zellen) zu infizieren. Die Vektor RNA wird mittels Reverser Transkriptase in DNA umgeschrieben und durch die virale Integrase in das Zellgenom integriert. Im optimalen Fall wird pro Zelle nur ein Fremdprotein gebildet. Da die DNA fest im Zellgenom integriert ist, können aussortierte Zellen weiterkultiviert und amplifiziert werden. Über spezifische Primer die Sequenzen der LTR Regionen erkennen, kann anschließend die integrierte DNA identifiziert werden.

4.2.1 Luciferasetest der CHO Zellen auf Infektion mit retroviralem Überstand

CHO-K1 Zellen können nicht mit MV infiziert werden und zeigen nur eine schwache Bindung des Virus. Da es sich um eine Hamster Zelllinie handelt, fehlen auch humane Oberflächenproteine. Die Zellen bieten sich daher zur Expression humaner Proteine an. Die Vira-Port cDNA Expressionsgenbank liegt in Form von nicht replizierfähigen Retroviren vor, die jedoch eine Integrase zur Insertion der Fremd-DNA beinhalten. Über das VSV-G Protein welches Histaminsäuren auf der Zielzelle erkennt sollte jede Zelllinie infiziert werden können. Um dies zu überprüfen, wurde ein Kontrollvirus geliefert das statt der humanen cDNA ein Luciferasegen enthält. NIH3T3 Zellen werden nach Angaben von Stratagene optimal durch die retrovirale Genbank sowie der Luciferase Viren infiziert. Diese wurden daher als Kontrolle zur Infektion der CHO Zellen verwendet. Dazu wurden pro Napf einer 6-well-Platte $5 \cdot 10^4$ Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert wodurch ca. 60 % Konfluenz erreicht wurde.

Die retroviralen Luciferase Viren wurden in Zehnerschritten von 1:10 bis $1:10^4$ mit Medium + DEAE-Dextran (10mg/ml) 1:1000 verdünnt. 1 ml der Virusverdünnung wurde zu den Zellen gegeben. Zur Kontrolle 1ml Medium ohne Virus.

Die Zellen werden 3 Std. bei 37°C inkubiert, danach wird 1 ml Medium (10 % FKS) zugegeben und für weitere 48 Std. bei 37°C inkubiert. Während dieser Zeit werden die Zellen durch die Retroviren infiziert und das Luciferasegen in das Zellgenom integriert und exprimiert.

Zur Messung der Luciferaseaktivität wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen einmalig mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 400 μl /well mit Lysepuffer (Promega) bedeckt. Die Zellen werden abgeschabt und jeweils 20 μl in eine 96-well-Platte zur Analyse gegeben.

Einstellung:

10 sec Messung, 2 sec delay

100 μl Luciferasemix (Promega)

Abb. 4-4 zeigt die relative Lumineszenz sowohl der CHO-Zellen als auch der NIH3T3-Kontrollzellen. Die Kontrollen mit nicht infizierten Zellen zeigen nur eine schwache Hintergrundlumineszenz von 100 während bei einer Verdünnung von 1:10 eine Lumineszenz von 280.000 relativen Einheiten bei CHO Zellen und 10.000 bei NIH3T3 Zellen beobachtet wurde. Selbst bei einer Verdünnung von $1:10^3$ zeigen die infizierten CHO Zellen noch eine Lumineszenz von 620, was immer noch die 6fache Lumineszenz im Vergleich zur Kontrolle bedeutet. Insgesamt war zu beobachten, dass die Lumineszenz der infizierten CHO-Zellen deutlich über derjenigen der NIH3T3-Zellen lag. Die CHO-Zellen sind daher hervorragend zur Infektion mit der retroviralen cDNA Expressionsgenbank geeignet.

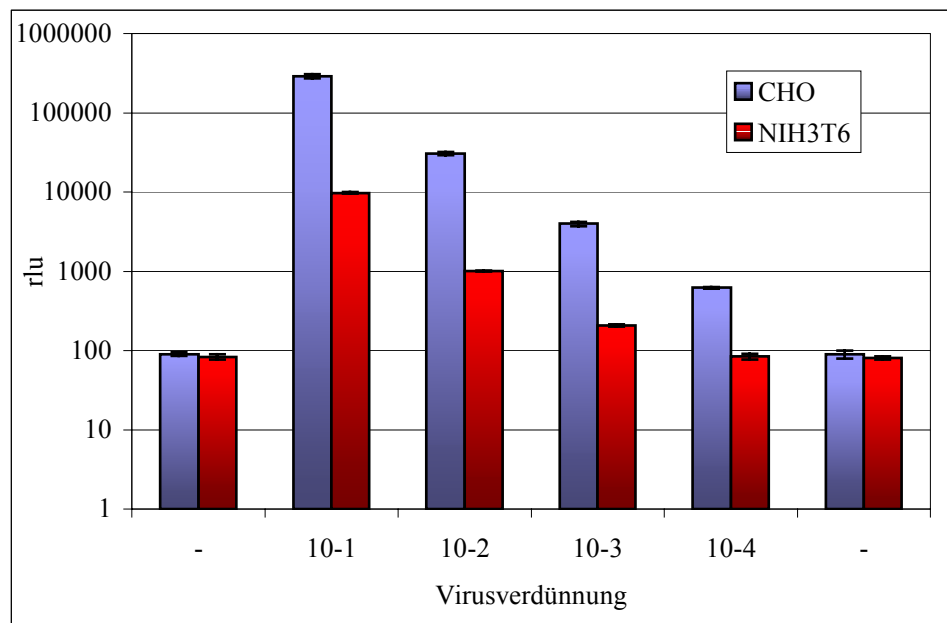


Abb. 4-4 Infektionskontrolle der CHO Zellen mit retroviralem Luciferase Kontrollvektor. CHO Zellen im Vergleich zu NIH3T3 Zellen. Dargestellt sind Virusverdünnungen von 1:10 bis $1:10^4$, sowie zwei Kontrollen (vor bzw. nach der Messung). Angegeben ist der Mittelwert der relativen Lumineszenz (rlu) aus drei Messungen.

4.2.2 Transduktion I der ViraPort™ VSV-G retroviralen cDNA Genbank

In 100 mm Zellkulturplatten wurden $5 \cdot 10^5$ CHO-Zellen ausgesät und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag sind die Zellen zu ca. 20 % konfluent. Eine Stunde vor Infektion wurde das Nährmedium (MEM, 10 % FKS) gegen frisches (vorgewärmtes) Medium ausgetauscht.

Der retrovirale Überstand wird bei 37°C aufgetaut. Um maximale Sterilität zu erreichen, wurde das Gefäß von außen mit 70 %igem EtOH gereinigt. Bis zur Verwendung wird das Virus auf Eis gelagert. Insgesamt enthält die Genbank $2,2 \cdot 10^6$ Viren in 1,8 ml Medium.

Der retrovirale Überstand wird mit DEAE-Dextran Nährmedium (1:1000 = 10 ml RPMI Medium + 10 µl DEAE) verdünnt.

Um eine MOI von 0,5-1 zu erreichen, wurden 400 µl Virus in 3 ml Medium (DEAE-Medium) verdünnt, was einer Anzahl $5 \cdot 10^5$ Viruspartikeln entspricht.

Die Zellen wurden mit 3 ml verdünntem Virus für 3 Std. bei 37 °C inkubiert. Nach Zugabe von 7 ml Nährmedium wurden die Zellen dann für weitere 48 Std. bei 37 °C bis zur 1. Sortierung inkubiert.

4.2.3 FACS-Sortierung der Retrovirus-infizierten CHO Zellen mittels AK 5C6

Die genbanktransduzierten CHO-Zellen (ca. $2 \cdot 10^6$) wurden mit HBSS EDTA 1 mM bei 37 °C abgelöst und mit FACS Puffer (PBS + 2% FKS) gewaschen. Sämtliche Schritte wurden in sterilen FACS Röhrchen und mit Einmal-Pipetten durchgeführt.

Der monoklonale Antikörper 5C6 wurde 1:40 in FACS Puffer verdünnt (5 µl auf 200 µl Puffer) und sterilfiltriert. Zur Kontrolle wurden CHO Zellen auf die gleiche Weise behandelt.

Die Zellen wurden dann für 45 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend 2 mal gewaschen. Als Zweitantikörper wurde ein α Maus-FITC Antikörper (Verdünnung 1:40) verwendet. Und ebenfalls 45 Minuten bei 4°C inkubiert. Nach 2 mal waschen mit FACS-Puffer wurden die positiven Zellen im Zellsorter aussortiert (**Abb. 4-5 A**).

Es wurden insgesamt 40.000 positive Zellen aussortiert. Diese wurden in eine 25 ml Kulturflasche ausgesät und vermehrt. Da die gewünschte cDNA im Zellgenom integriert ist, können die Zellen durch normale Zellkultur ohne Selektionsdruck vermehrt werden.

4.2.4 Transduktion II der ViraPort™ VSV-G retroviralen cDNA Genbank

Bis auf geringe Unterschiede wurde die zweite Infektion mit retroviralem Überstand auf die gleiche Weise durchgeführt wie die erste (4.2.2). Die MOI wurde leicht erhöht. Auf $5 \cdot 10^5$ ausgesäte CHO-Zellen wurden nach Übernachtskultur $8,9 \cdot 10^5$ Viruspartikel gegeben. 800 μ l Virus wurden in 3,5 ml DEAE-Medium verdünnt. Nach 3 Stunden bei 37 °C wurden 7 ml Nährmedium (MEM 10 % FKS) zugegeben.

Um ein besseres Zellwachstum zu gewährleisten, wurden die Zellen nach 24 Stunden auf zwei 250 ml Kulturflaschen überführt. Vor der Sortierung im Zellsorter wurden diese Zellen mit Miltenyi Magnet Beads vorselektiert.

4.2.5 Sortierung der Genbank Transduktion II mit Magnet-Beads

Die Zellen aus 4.2.4 wurden nach 50 Stunden Kultivierung bei 37 °C mit HBSS 1mM EDTA abgelöst. Die $1 \cdot 10^7$ Zellen wurden mit PBS gewaschen. Die Färbung erfolgte in PBS 2% FKS mit mAK 5C6 1:40. Gefärbt wurden die Zellen in zwei Ansätzen mit jeweils 300 μ l verdünntem Antikörper über 30 Minuten bei einer Temperatur von 4°C.

Nach Waschen mit MACS Puffer wurden die Zellen in 180 μ l MACS Puffer aufgenommen und mit 30 μ l Anti IgG1+2 Magnet-Beads für 15 min bei 6 °C inkubiert. Vor der Inkubation wurde einmal gewaschen. Die Magnetsäule wurde in den Magneten eingehängt und mit 500 μ l entgastem MACS-Puffer equilibriert und die Zellen auf die Säule gegeben. Nach dreimaligem Waschen mit 500 μ l Puffer bleiben nur die positiven Zellen an der Magnetsäule haften. Die Säule wird daraufhin dem Magneten entnommen und der Flow-Resistor entfernt. Die positiven Zellen wurden mit 1 ml Puffer in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Wie unter 4.2.4 wurden die positiven Zellen weiterkultiviert und die negativ selektierten Zellen eingefroren.

4.2.6 2. Sortierung der Transduktion I+II mit Magnet-Beads

Zur weiteren Anreicherung positiver Zellen wurden die Zellen aus **4.2.2** (nach 9 Tagen Kultur) und **4.2.4** (nach 7 Tagen Kultur) nochmals über eine Magnet-Säule sortiert. Dazu wurden die Zellen mit 3 ml 5C6 (1:40) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend mit 80 µl Micro-Beads Goat anti-mouse IgG (Miltenyi Biotec) für 15 min bei 6 °C inkubiert. Die positiven Zellen wurden mit 1 ml Puffer in ein 1,5 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die negativen Zellen wurden über eine 2. Säule erneut selektiert und mit den Zellen der ersten Säule zusammen kultiviert.

4.2.7 2. FACS-Sortierung der CHO-Zellen mit AK 5C6

Sämtliche positiven Zellen aus **4.2.6** wurden 5 Tage nach der Magnet-Bead-Selektion für die FACS Sortierung markiert. Gefärbt wurden die positiv sortierten Zellen sowie als Kontrolle die negativ selektierten Zellen. $7 \cdot 10^6$ Zellen der positiven Selektion 4.2.6 wurden mit 1,8 ml PBS mit 2% FKS und 5C6 (1:40) für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert und anschließend mit 1,8 ml FITC (1:40) ebenfalls für 30 Minuten bei 4 °C inkubiert. Aus den $7 \cdot 10^6$ Zellen wurden $5 \cdot 10^4$ stark positive Zellen aussortiert (**Abb. 4-5 B**). Zur Kontrolle wurden auch die zuvor negativ aussortierten Zellen nochmals sortiert. Es konnten jedoch aus $2 \cdot 10^7$ Zellen nur $1 \cdot 10^3$ Zellen positiv sortiert werden.

Durch die vorangegangenen Sortierungen konnten demnach 5C6 positive CHO-Zellen angereichert werden.

4.2.8 3. Sortierung der genbankinfizierten CHO-Zellen mit AK 5C6

Die nach Proliferation erhaltenen $2,37 \cdot 10^6$ Zellen aus **4.2.7** wurden mit 700 µl mAK 5C6 1:40 (entspricht 100 µl AK Verdünnung pro $2 \cdot 10^5$ Zellen) in PBS (2% FKS+EDTA 2mM) für 30 Minuten inkubiert. 2 mal gewaschen und mit 80 µl Puffer + 30 µl MicroBeads Goat anti-Mouse IgG für 15 Minuten bei 6°C inkubiert.

Anschließend wurden die Zellen zusätzlich für 15 Minuten mit 15 µl FITC versetzt um eine Analyse im FACS zu ermöglichen.

Abb. 4-5 C zeigt die deutliche Anreicherung von 5C6 positiven Zellen. Im Zellsorter wurden aus den $2,37 \cdot 10^6$ Zellen $2 \cdot 10^5$ positive Zellen selektiert.

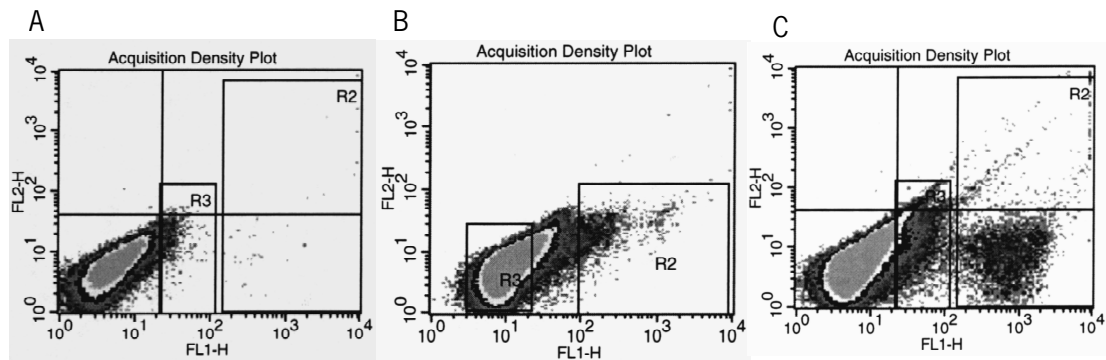


Abb. 4-5 FACS-Sortierung der humanen retroviralen Expressions-Genbank. In 100 mm Zellkulturplatten wurden $5 \cdot 10^5$ CHO Zellen ausgesät. Bei ca. 20% Konfluenz wurden die Zellen mit 400 μ l Virus in 3 ml Medium (DEAE-Medium) verdünnt. Dies entspricht $5 \cdot 10^5$ Viruspartikeln und einer MOI von etwa 1. Im FACS-Sorter wurden mAK 5C6 gefärbte Zellen aussortiert. Nach der ersten Sortierung wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen aussortiert und amplifiziert (**A**). In der zweiten Selektion wurden aus $7 \cdot 10^6$ Zellen $5 \cdot 10^4$ positive Zellen aussortiert (**B**). Bei der dritten Selektion zeigt sich eine deutliche Anreicherung positiver Zellen (**C**). Aus $2,37 \cdot 10^6$ Zellen wurden $2 \cdot 10^5$ stark positive Zellen aussortiert.

4.2.9 Subklonierung der transformierten CHO-Zellen

Nach der Selektion 5C6 positiver Zellen waren in der FACS-Analyse mehrere Peaks (**Abb. 4-6 B**) zu erkennen. Die Zellen wurden deshalb zur Isolierung einzelner Klone subkloniert. Dazu wurden $1 \cdot 10^4$ Zellen in 96-well-Platten ausgesät und in 10er Schritten verdünnt bis nur 1 Zelle pro Napf enthalten war. Diese Zellen wurden weiter kultiviert und anschließend im FACS auf die Bindung des AK 5C6 untersucht. **Abb. 4-6** zeigt vier unterschiedliche Klone (**C-F**) sowie die Isotypkontrolle (**A**). Klon E (**E**) zeigte sich als deutlich positiv. Klon E zeigte eine starke Bindung von MV-WTFb und konnte zudem gut mit MV infiziert werden (**4.4, 4.5**). Klon E wurde deshalb nochmals subkloniert und für alle weiteren Versuche verwendet. **Abb. 4-7** zeigt die klonierten Zellen im direkten Vergleich zu normalen CHO-K1 Zellen, die zur Infektion verwendet wurden. Die FACS Analyse sowie die Fluoreszenzmikroskopaufnahmen zeigen deutlich die positive Selektion der Zellen durch den 5C6 Antikörper. Die anderen Klone wurden nicht näher untersucht.

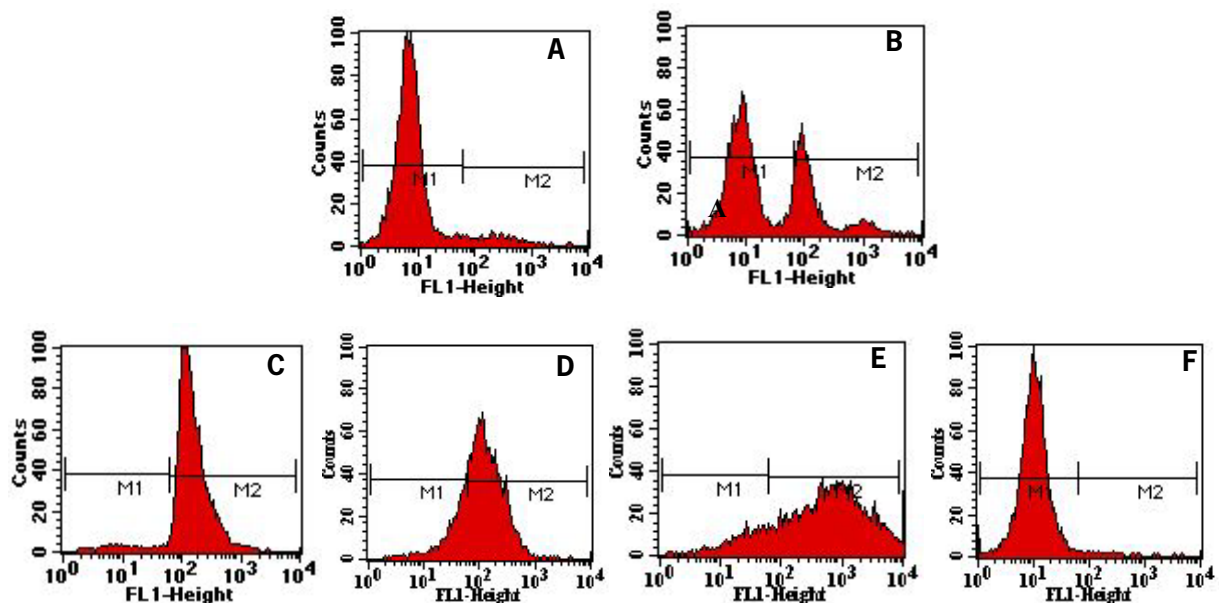


Abb. 4-6 Subklonierung der selektierten CHO-Zellen. Jeweils $1 \cdot 10^5$ Zellen wurden mit 5C6 Antikörper sowie einem FITC- Zweitantikörper markiert und im Durchflusszytometer analysiert. Zur Kontrolle dienten untransformierte CHO-Zellen (**A**). Angegeben sind die Diagramme vor der Subklonierung (**B**) sowie vier verschiedener Klone mit unterschiedlich starker SLAM Expression (**C-F**).

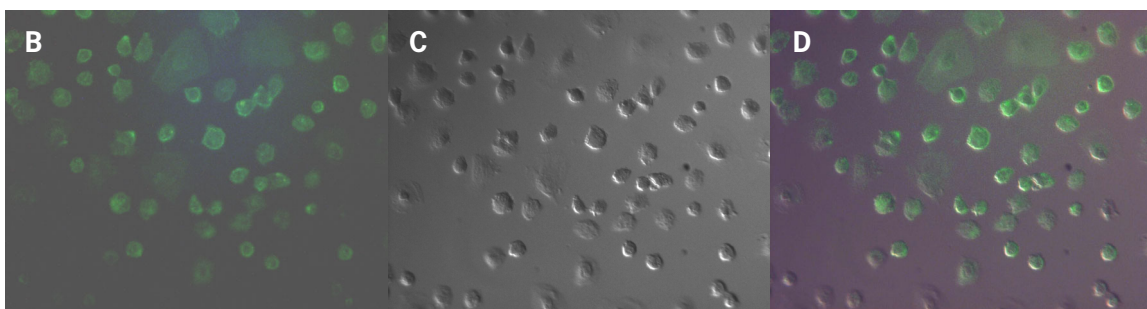
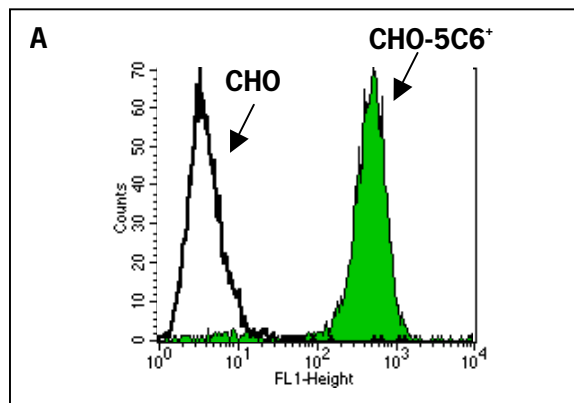


Abb. 4-7 CHO im Vergleich zu den selektierten 5C6 positiven CHO-Zellen. Im FACS-Diagramm sind die deutlich positiven CHO-5C6⁺ Zellen im Vergleich zu CHO Zellen dargestellt (A). Die starke Färbung der Zellen wird auch unter dem Fluoreszenzmikroskop sichtbar (B-D). Dargestellt ist die grüne Fluoreszenz nach SLAM Färbung (B), normale Lichtmikroskopaufnahme (C), sowie eine Überlagerung der beiden Bilder (D). (Vergrößerung 40x)

4.2.10 DNA Extraktion der selektierten Zellen (Klon E)

Da die cDNA im Genom integriert ist, kann über spezifische Primer (3'pFB, 5'retro), die an den LTR-Sequenzen der integrierten Vektor-DNA ansetzen, die unbekannte cDNA identifiziert werden. Dazu muss die gesamte zelluläre DNA gewonnen und einer PCR unterzogen werden.

2·10⁶ der sortierten Zellen wurden in 700 µl DNA Extraktions-Lysepuffer mit 35 µl Proteinkinase K (10 mg/ml) für 15 Minuten bei 56 °C inkubiert. Mit 250 µl NaCl wurden die lysierten Zellen ca. 3 Minuten gevortext und 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert. Jeweils 750 µl des Überstandes wurden abgenommen und mit 500 µl Isopropanol 2 Minuten gemischt. Nach 2 Minuten wurde erneut für 10 Minuten und 13.000 rpm zentrifugiert. Nach Abkippen des Überstandes wurde mit 500 µl Isopropanol gewaschen und die DNA in H₂O aufgenommen. Zum Lösen der DNA wurde sie für 2 Stunden bei 37 °C inkubiert. Das DNA-Gel der gereinigten genomischen DNA ist in **Abb. 4-9** Spur 1 dargestellt.

4.2.11 PCR der genomischen DNA aus den selektierten Zellen

Für die PCR werden die Primer 3'pFB sowie 5'-retro, die zur Genbank mitgeliefert wurden auf 100 ng/µl eingestellt und ein Teil im Verhältnis 1:1 vermischt. Für die Reaktion wurde folgender PCR Ansatz verwendet:

- 2 µl DNA (2µg)
- 1 µl Taq Polymerase
- 1,5 µl Primer Mix
- 2 µl dNTP
- 1 µl MgCl₂
- 10 µl Puffer

Während folgende PCR Zeiten eingestellt wurden:

3 min 95°C	1 Zyklus
<hr/>	
1 min 95°C	
3,5 min 72°C	35 Zyklen
<hr/>	
30 min 72°C	1 Zyklus

Im PCR-Gel der transduzierten Zellen sind 6 unterschiedliche DNA-Banden zu erkennen (**Abb. 4-9 A Spur 1-3**). Diese wurden aus dem Gel ausgeschnitten und über PCR Purifikation Kit (Qiagen) gereinigt (**Abb. 4-9B**). Durch eine weitere PCR der gereinigten Banden zeigte sich, dass nur eine ca. 1,7 kb sowie eine 1,4 kb große Bande spezifisch amplifiziert werden konnten. Eine Sequenzierungs PCR war jedoch mit diesen Primern nicht möglich.

Zur Sequenzierung der DNA werden Primer verwendet (pFB1 und pFB2), die wenige Basenpaare vor den mitgelieferten Primern, innerhalb der integrierten cDNA, sitzen.

Über diese Sequenzier-PCR konnte die integrierte cDNA identifiziert werden. Die cDNA innerhalb der selektierten CHO Zellen kodiert für das Protein **CD150** oder auch **SLAM (Signaling lymphocytic activation molecule)**.

Um die genaue Sequenz der integrierten SLAM cDNA zu bestimmen, wurden zahlreiche weitere Sequenzier PCRs durchgeführt, deren Primerlokalisationen in **Abb. 4-10** zusammengefasst sind.

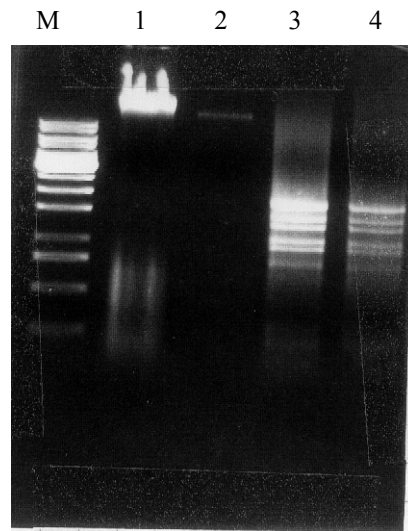


Abb. 4-8 DNA-Gel der gereinigten genomischen DNA der selektierten CHO-Zellen (**Spur 1**), DNA Banden nach PCR von CHO-Zellen (**Spur 2**), sowie PCR der selektierten CHO-Zellen Spur (**3 und 4**).

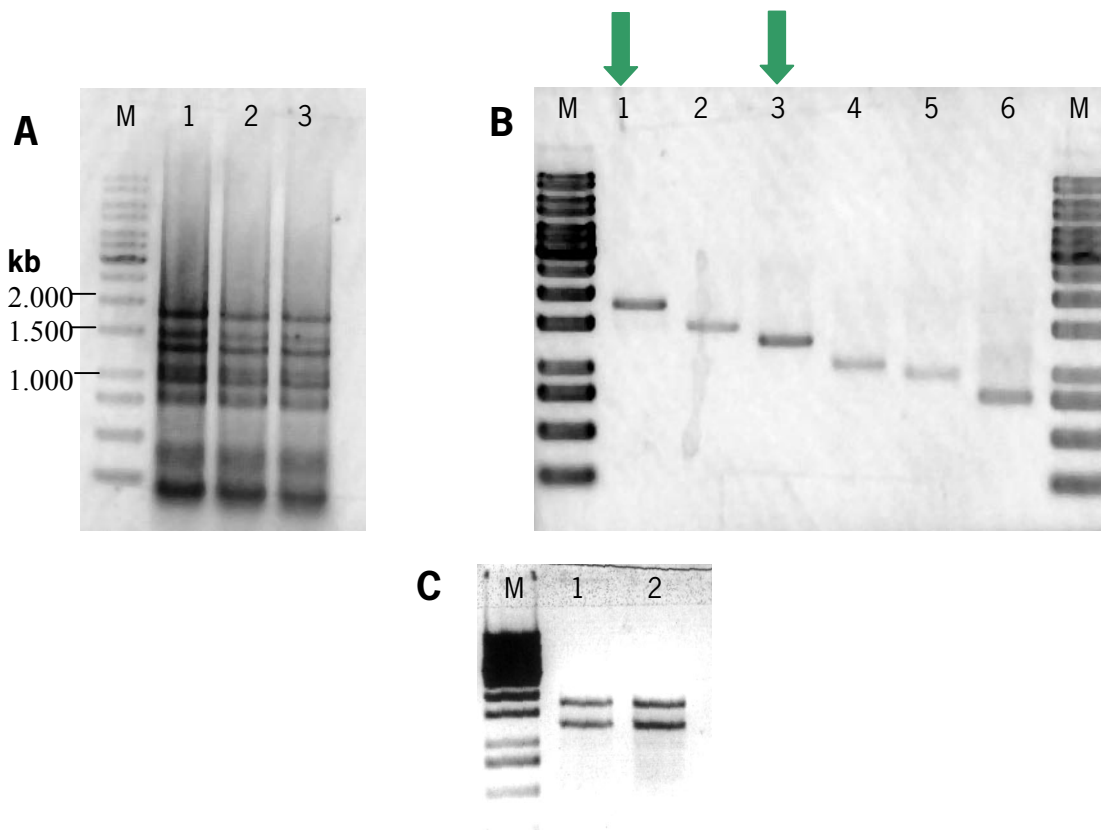


Abb. 4-9 PCR der genomischen DNA aus selektierten CHO-SLAM-Zellen. Verwendet wurden die Primer 3'pFB sowie 5'-retro. In (A) sind die 3 Ansätze der PCR angegeben. (B) zeigt die einzelnen PCR Banden nach Ausschneiden aus Gel (A). Die Banden in Spur (B) 1 und 3 erwiesen sich als spezifisch und konnten über Primer pFB1 und pFB2 amplifiziert (C Spur 1+2) und als SLAM-DNA identifiziert werden.

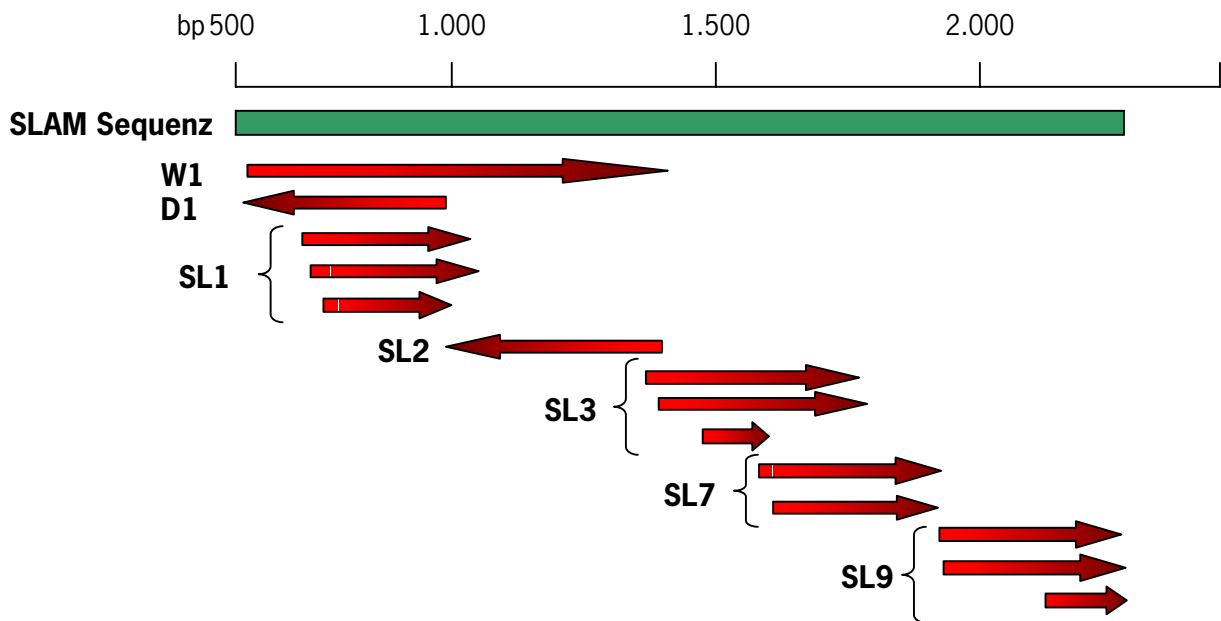


Abb. 4-10 Sequenzier PCR. Dargestellt ist die SLAM Sequenz nach *Cocks et al.* (grün) sowie die Sequenzier-Bereiche (rot) mit der jeweiligen Angabe des verwendeten Primers.

4.2.12 Kommerziell erhältliche Antikörper erkennen CD150 auf der Oberfläche der selektierten CHO Zellen

Wie die Sequenzierung der in den CHO-Zellen integrierten cDNA zeigte, kodiert sie für das Protein SLAM (CD150). Wenn die selektierten Zellen die DNA für SLAM enthalten, sollte auch das zugehörige Protein gebildet werden. Die Proteinexpression wurde daher im Folgenden über SLAM spezifische Antikörper getestet und das Signal mit dem des mAK 5C6 verglichen. **Abb. 4-11** zeigt die FACS Diagramme der selektierten CHO-Zellen sowie die zugehörigen Mittleren Fluoreszenz Intensitäten (MFI) fünf verschiedener Antikörper. Neben dem 5C6 Antikörper wurden die SLAM spezifischen Antikörper IPO-3 sowie CDw150 verwendet. CD150 gehört zur CD2-Gruppe der Zelloberflächenproteine. Zusätzlich wurden daher Antikörper dieser Gruppe gegen CD58 sowie CD48 getestet, um die Spezifität des monoklonalen Antikörpers 5C6 zu überprüfen. CD58 ist zu 17 % mit CD150 identisch, CD48 zu 26 %. Dazu wurden $5 \cdot 10^4$ der cDNA selektierten Zellen Klon E für 7 Minuten mit PFA 4 % fixiert und anschließend mit dem entsprechenden Antikörper mit einer Konzentration von $2 \mu\text{g/ml}$ für 45 Minuten inkubiert und einem Ratte Anti-Maus FITC Zweitantikörper gefärbt.

Die Antikörper gegen CD58 und CD48 zeigten keine höhere MFI im Vergleich zur Isotypkontrolle. Die verwendeten anti-SLAM Antikörper konnten dagegen die selektierten Zellen binden, was zu deutlicher

Färbung der Zellen führte. Dabei zeigte sich, dass der IPO-3 Antikörper bei Verwendung der gleichen Konzentration die stärkste Bindung an SLAM aufweist, gefolgt von 5C6. Die schwächste Bindung wurde bei Verwendung des CDw150 Antikörpers nachgewiesen.

Das auf den CHO-Zellen exprimierte Protein konnte somit eindeutig als SLAM (CD150) identifiziert werden. Die transduzierten CHO-Zellen werden im Folgenden als CHO-SLAM Zellen bezeichnet.

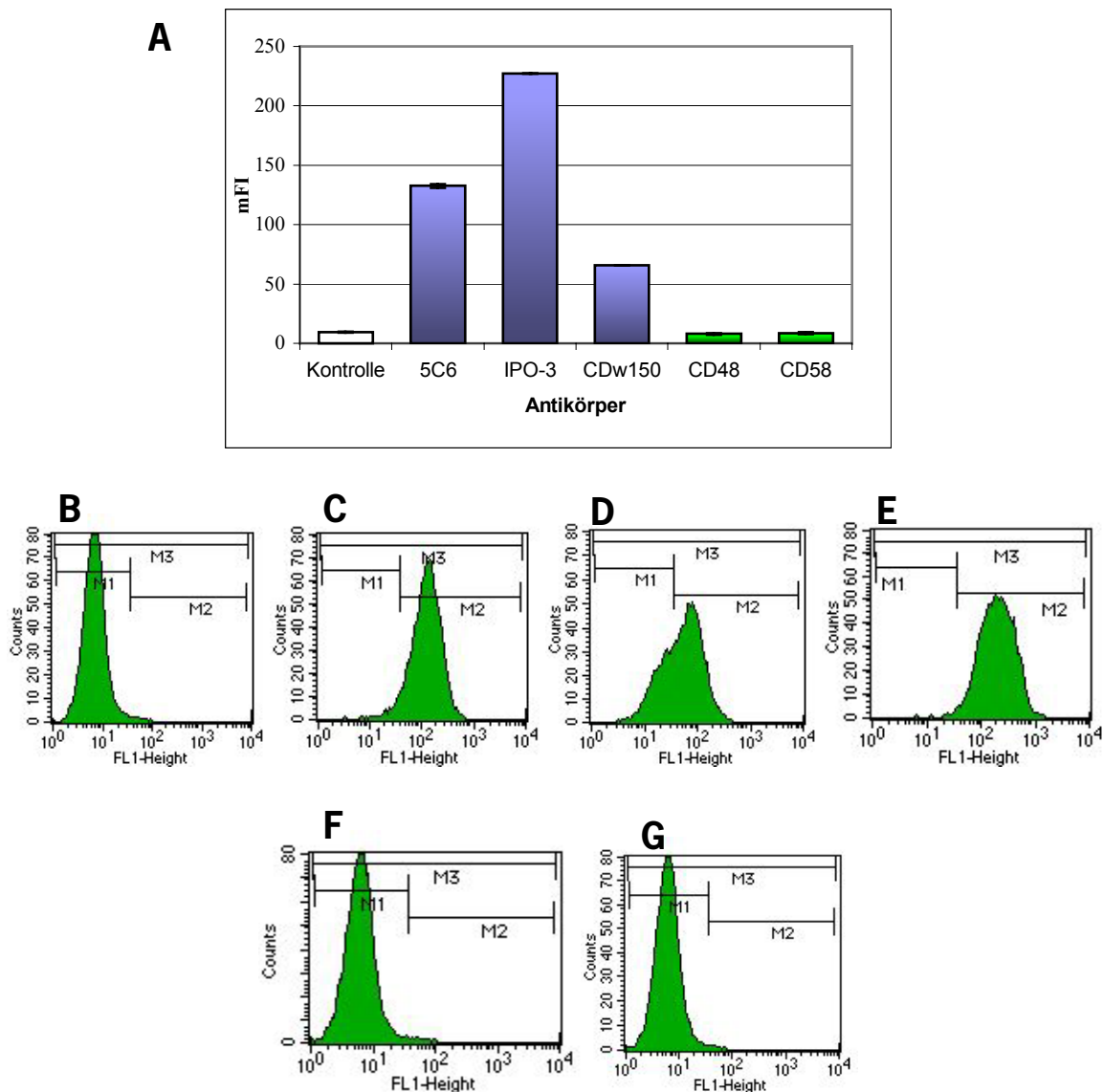


Abb. 4-11 Test verschiedener anti-SLAM Antikörper auf den transduzierten und selektierten CHO Zellen. Die selektierten CHO-Zellen Klon E wurden neben einer Isotypkontrolle (**B**) mit den anti-SLAM Antikörpern 5C6 (**C**), CDw150 (**D**), IPO3 (**E**) sowie den CD2-Gruppe der Oberflächenproteine zugehörigen Antikörper gegen CD48 (**F**), CD58 (**G**) markiert. Dargestellt sind die Diagramme des Durchflusszytometers sowie eine Übersicht der zugehörigen MFI-Werte (**A**).

4.2.13 5C6 erkennt SLAM auf der Oberfläche von B95a Zellen und PBL

SLAM wird schnell auf unreifen Thymozyten aktiviert (Cocks *et al.*,1996). Insbesondere ist SLAM auf aktivierten T-Zellen, Gedächtnis- T-Zellen sowie B-Zellen und Dendritischen Zellen (DC) zu finden. Da der anti-SLAM Antikörper 5C6 durch Mausimmunisierung mit B95a-Zellen hergestellt wurde, war zu erwarten, dass auch die Affenzelllinie SLAM exprimiert. Zudem wurde die Expression auf Peripheren Blut Lymphozyten getestet. B95a Zellen wurden dazu abgelöst, mit PFA fixiert und mit AK 5C6 markiert. Im Durchflusszytometer (**Abb. 4-12**) ist im Vergleich zur Isotypkontrolle deutlich die starke SLAM-Expression zu erkennen. Die über EBV transformierte Zell-Linie exprimiert also auch ohne Stimulation große Mengen von SLAM an der Zelloberfläche.

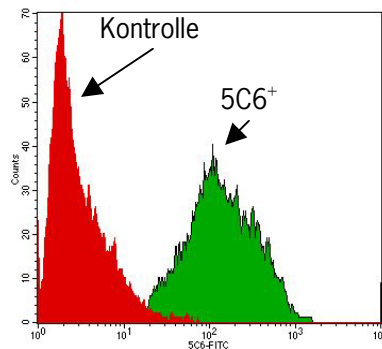


Abb. 4-12 SLAM Expression auf der Oberfläche von B95a Zellen. B95a Zellen wurden mit anti-SLAM mAK 5C6 an der Zelloberfläche markiert und im Durchflusszytometer getestet. Dargestellt sind die FACS Diagramme der 5C6 markierten Zellen (**grün**) im Vergleich zur Isotypkontrolle (**rot**).

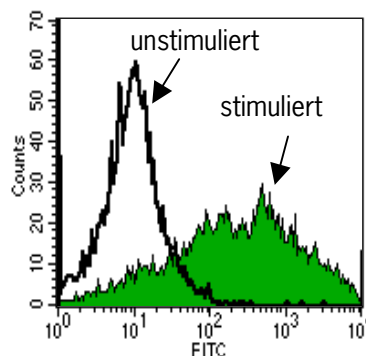


Abb. 4-13 SLAM Expression auf der Oberfläche von PBL. Die FACS Diagramme zeigen unstimulierte PBL (**schwarze Linie**) sowie Zellen die über 48 Stunden mit PHA aktiviert und anschließend mit 5C6 an der Oberfläche markiert wurden (**grün**).

Auf PBL ist bei Betrachtung der FACS Kurve (**Abb. 4-13**) eine geringe Expression von SLAM zu erkennen, solange die Zellen nicht aktiviert wurden. Nach Aktivierung der Zellen mit PHA über 48 Stunden zeigt sich dagegen eine starke Expression von SLAM an der Zelloberfläche.

4.2.14 Bindungsinhibition an PBMC durch AK 5C6 oder CD46

Zuvor konnte gezeigt werden, dass gegen SLAM gerichtete Antikörper die Bindung von WTFb an B95a Zellen inhibieren können (**4.1.2**). Die Inhibition auf humanen peripheren Blutzellen war jedoch noch unklar. Deshalb wurde die Bindung der Wildtypviren WTFb und Wü5679 (**Abb. 4-14**) und der Impfstamm MV Edm und Edm-Zag an PBMC untersucht.

$5 \cdot 10^4$ Zellen wurden mit PHA für 1 Tag stimuliert um eine ausreichende SLAM Expression hervorzurufen. CD46 wird ebenfalls auf PBMCs exprimiert.

Der mAK 5C6 anti-SLAM blockiert die Bindung der Wildtypen an PBMC teilweise bereits bei einer Konzentration von 2 $\mu\text{g/ml}$. Bereits bei dieser geringen Konzentration ist eine Inhibition der WTFb Bindung von 30 % zu erkennen, bei Wü5679 sogar um 40 % (**Abb. 4-14 B, D**).

Eine Erhöhung der Antikörperkonzentration bewirkt eine stärkere Bindungsinhibition. Bei Verwendung von 50 mg/ml Antikörper kann so die Bindung von WTFb und Wü5679 um 60 % vermindert werden.

Der Antikörper 13/42 gegen CD46 hatte keinen Einfluss auf die Bindung der Wildtypviren. Auch bei Verwendung beider Antikörper konnte keine Verstärkung des inhibitorischen Effekts von mAK 5C6 festgestellt werden. Es zeigte sich sogar eine leichte Erhöhung der Virusbindung.

Keinen Effekt zeigte die Inkubation mit mAK 5C6 anti-SLAM auf die Bindung der Impfstammviren Edm und Edm-Zagreb. Auch bei Verwendung von 50 mg/ml wurde die Bindung bei Edm nur sehr schwach (**Abb. 4-15 A,B**) bis gar nicht (**Abb. 4-15 C,D**) beeinflusst.

Wie zu erwarten war, blockierte der Antikörper anti-CD46 13/42 die Bindung von Edm und Edm-Zag an PBMC fast vollständig. Schon bei einer AK Konzentration von 2 μg wurde die Virusbindung um ca. 90 % gehemmt.

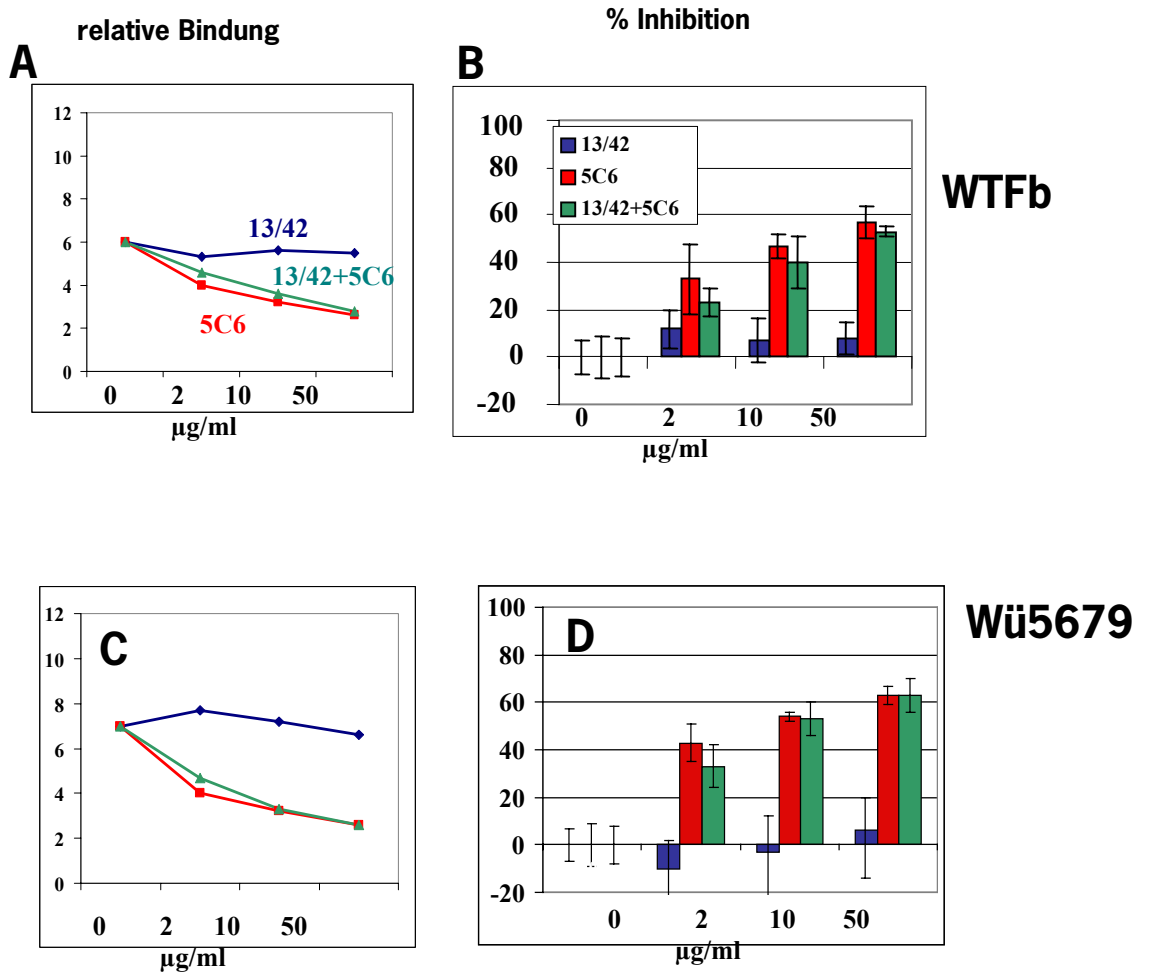


Abb. 4-14 Bindungsinhibition von MV-Wildtyp an PBMC. PBMC wurden für 1 Stunde mit steigender Antikörperkonzentration (80-50 µg/ml) mit AK 5C6 (**rot**) allein, 13/42, der die erste Domäne von CD46 erkennt (**blau**) sowie beiden AK zusammen (**grün**) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit MV Wildtystämmen WTFb oder Wü5679 inkubiert und die gebundene Virusmenge im Durchflusszytometer bestimmt. Gezeigt ist die MFI von drei Experimenten als relative Virus-Bindung über Hintergrund (**A, C**) sowie die daraus resultierende prozentuale Inhibition der Virusbindung (**B, D**).

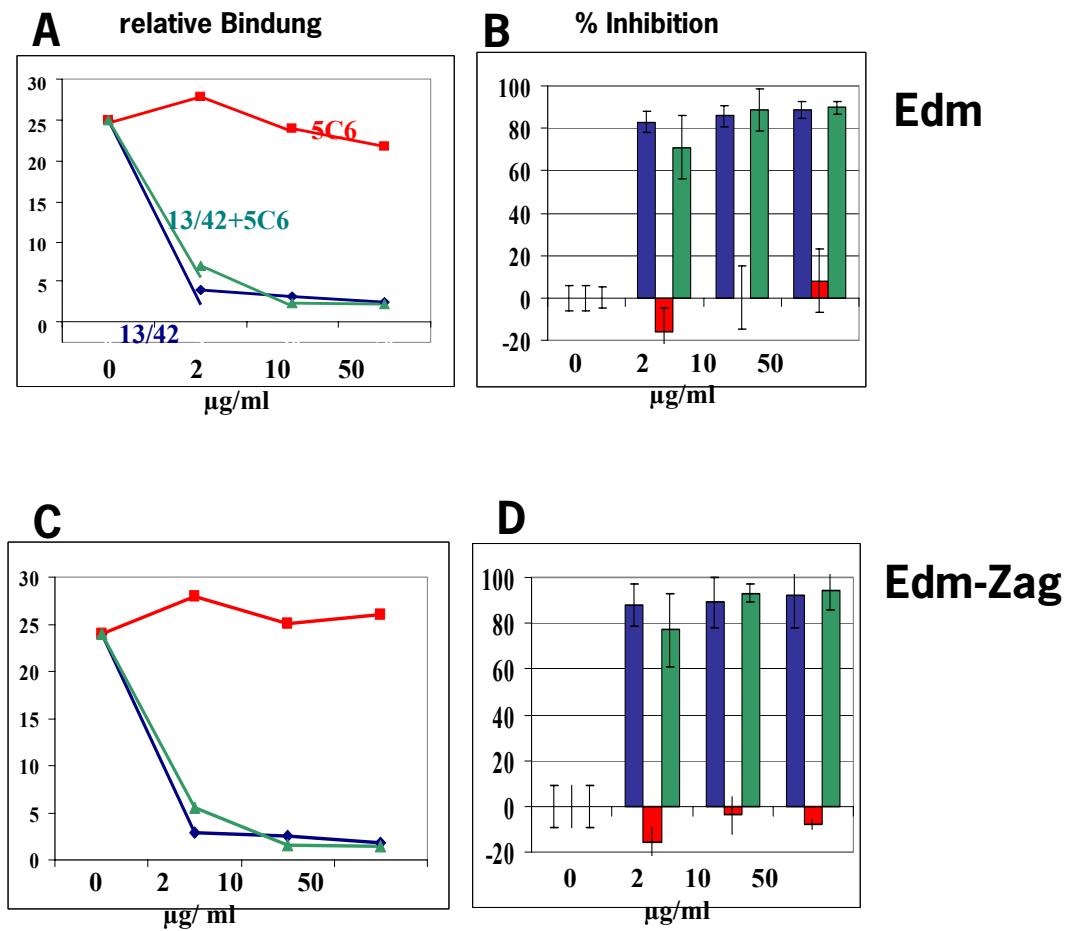


Abb. 4-15 Bindungsinhibition von MV Impfstämmen an PBMC. PBMC wurden für 1 Stunde mit steigender Antikörperkonzentration (80-50µg/ml) mit AK 5C6 (**rot**) allein, 13/42, der die erste Domäne von CD46 erkennt (**blau**) sowie beiden AK zusammen (**grün**) inkubiert. Die Zellen wurden anschließend mit MV Impfstamm Edm oder Edm-Zag inkubiert und die gebundene Virusmenge im Durchflusszytometer bestimmt. Gezeigt ist die MFI von drei Experimenten als relative Virus-Bindung über Hintergrund (**A,C**) sowie die daraus resultierende prozentuale Inhibition der Virusbindung (**B,D**).

4.2.15 SLAM Protein Expression der selektierten CHO-SLAM Zellen

In **4.2.13** konnte gezeigt werden, dass SLAM auf der Oberfläche sowohl von B95a, als auch PBMCs zu finden ist. Im Western-Blot wurde die SLAM-Expression verschiedener Zell-Linien untersucht. $1 \cdot 10^6$ Zellen wurden dazu in 500 μ l NP-40 Lysepuffer aufgenommen und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Abzentrifugieren des Zelldebris wurde der Proteinüberstand auf 1 μ g/ μ l eingestellt und 100 μ g Protein im 10 %igen Polyacrylamidgel nicht reduzierend aufgetrennt. Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulosemembran mit 5C6 (0,73 μ g/ μ l) in einer Verdünnung von 1:400 über Nacht bei 4°C inkubiert.

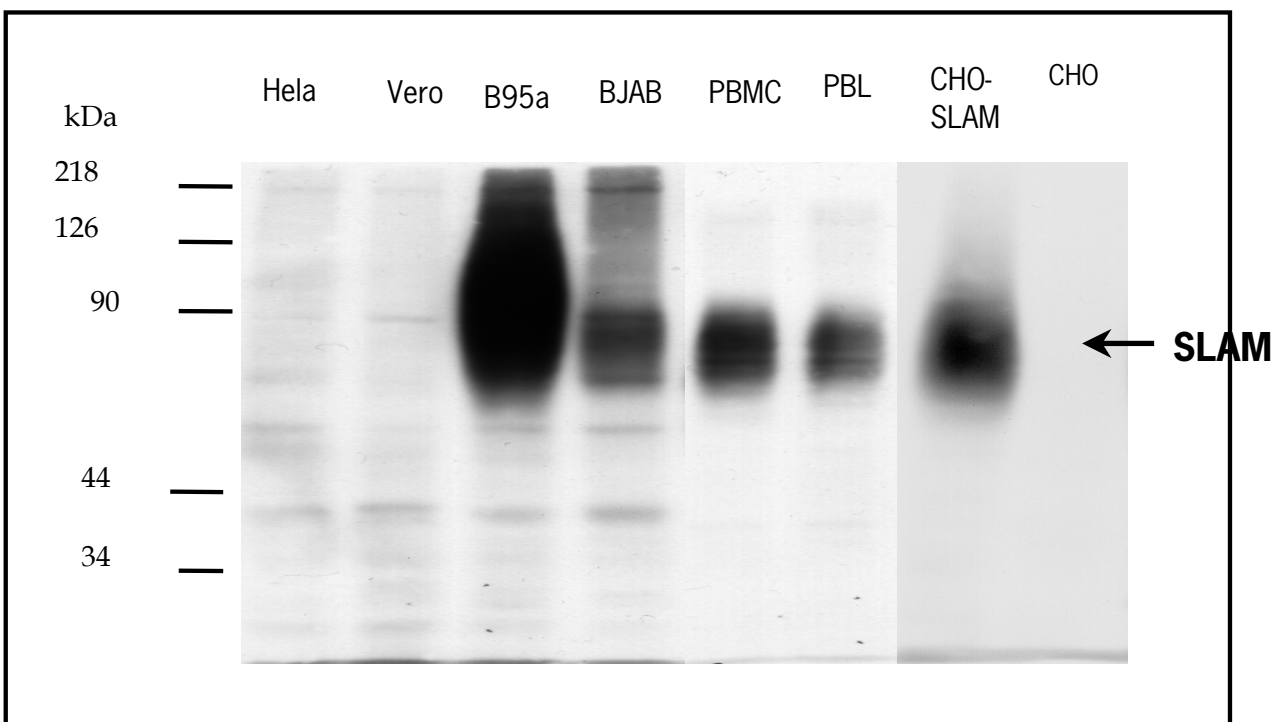


Abb. 4-16 SLAM Protein Expression der CHO-Zellen. 100 μ g Protein wurde nach Zellysat von HeLa, Vero, B95a und BJAB Zellen, von PHA-aktivierten PBMC und PBL sowie von CHO-SLAM und CHO-Zellen (**Spur 1-8**) im SDS-PAGE aufgetrennt und geblottet. Die Nitrozellulose wurde mit AK 5C6 und Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Banden wurden über ECL System (Amersham) sichtbar gemacht.

HeLa-, Vero- und CHO- Zellen zeigten kein spezifisches Signal, während der Antikörper 5C6 Proteine in den Lysaten der B95a-, BJAB- Zellen sowie aktivierten PBMC, PBL und auch auf den transduzierten CHO-SLAM Zellen erkennt (**Abb. 4-16**). SLAM wurde sehr stark exprimiert auf B95a-Zellen. Durch die starke Glykosylierung von SLAM erscheint eine diffuse Bande, die sich zwischen 70 und 200 kDa

befindet. Eine klare Bande ist dagegen bei den humanen Zell-Linien zu erkennen. Insbesondere bei primären Zellen sowie bei CHO-SLAM Zellen ist die SLAM Bande deutlich im Bereich zwischen 70 und 90 kDa sichtbar. Bei Verwendung des IPO-3 Antikörpers wurden entsprechende Ergebnisse in unserer Arbeitsgruppe erzielt. Der Antikörper 5C6 erkennt somit SLAM sowohl auf Affen als auch auf humanen lymphoiden Zellen. Wie zu erwarten war ist SLAM nur auf den lymphoiden Zellen zu finden, nicht jedoch auf HeLa- oder Vero- Zellen.

4.3 SLAM mRNA-Expression verschiedener Zell-Linien

Aus $5 \cdot 10^6$ Zellen wurde über RNeasy Mini Kit (Qiagen) die RNA verschiedener Zell-Linien isoliert. Die Zellen wurden dazu mit 600 μ l RTL Puffer über Qias shredder homogenisiert und für 2 min bei 13.000 rpm in der Tischzentrifuge zentrifugiert. Mit 1 Vol 70% EtOH wurde das Homogenat auf eine Spinsäule gegeben und für 15 sec bei 8000 g (10.000 rpm) zentrifugiert. Nach dem Waschen der Säule wurde die RNA mit 50 μ l H₂O eluiert. Die Produktivität der RNA Isolation wurde im RNA Gel kontrolliert und die RNA Konzentration photometrisch bestimmt.

Für die reverse Transkription wurden 1 μ g RNA mit 1 μ l Oligo (dT) 12-18 Primer, 1ml dNTP-Mix (10 mM) und H₂O in insgesamt 12 μ l Flüssigkeit für 5 min bei 65 °C inkubiert. Nach kurzer Abkühlung auf Eis und zentrifugieren, wurden 4 μ l 5x Firststrand Puffer zugegeben sowie 2 μ l 0,1M DTT und 1 μ l H₂O. Dies wurde bei 42 °C vorgewärmt, bevor 1 μ l Superskript II Reverse Transkriptase zugegeben wird. Die reverse Transkription läuft dann über 50 min bei 42 °C. Die Inaktivierung erfolgt für 15 min bei 70 °C.

Die anschließende PCR wurde mit 1 μ l des RT-Ansatzes durchgeführt sowie 2 μ l Primer und PCR-Beads (Amersham). Als Primer wurden die SLAM-spezifischen Primer S1 und D1 verwendet. Bei Vorhandensein von SLAM cDNA wird eine Bande von 441 bp amplifiziert.

Zur Kontrolle des gesamten cDNA Gehaltes wurde gleichzeitig eine PCR mit β -Aktin Primern durchgeführt.

Abb. 4-17 zeigt die PCR verschiedener Zell-Linien. Während CHO- sowie CHO-CD46 Zellen keine SLAM-RNA exprimieren, ist der SLAM-RNA Gehalt in den CHO-SLAM Zellen sehr groß. Eine SLAM-RNA Expression konnte zudem auf B95a-, BJAB- sowie U937x-Zellen festgestellt werden. Dabei ist der höchste SLAM-RNA Gehalt in den CHO-SLAM Zellen zu finden. Ähnlich hohe Mengen wurde in B95a-

Zellen exprimiert. Deutlich weniger SLAM-RNA exprimieren dagegen die BJAB Zellen. U937x Zellen bilden nur sehr geringe Mengen an SLAM-RNA.

In CHO-, U937-, Vero-, HeLa- sowie Jurkat-Zellen konnte keine SLAM-RNA nachgewiesen werden. Interessant ist daher die Feststellung, dass U937-Zellen, die CD46 exprimieren, keine messbaren Mengen an SLAM aufweisen. In U937x- Zellen, denen CD46 fehlt, ist SLAM-RNA nachweisbar.

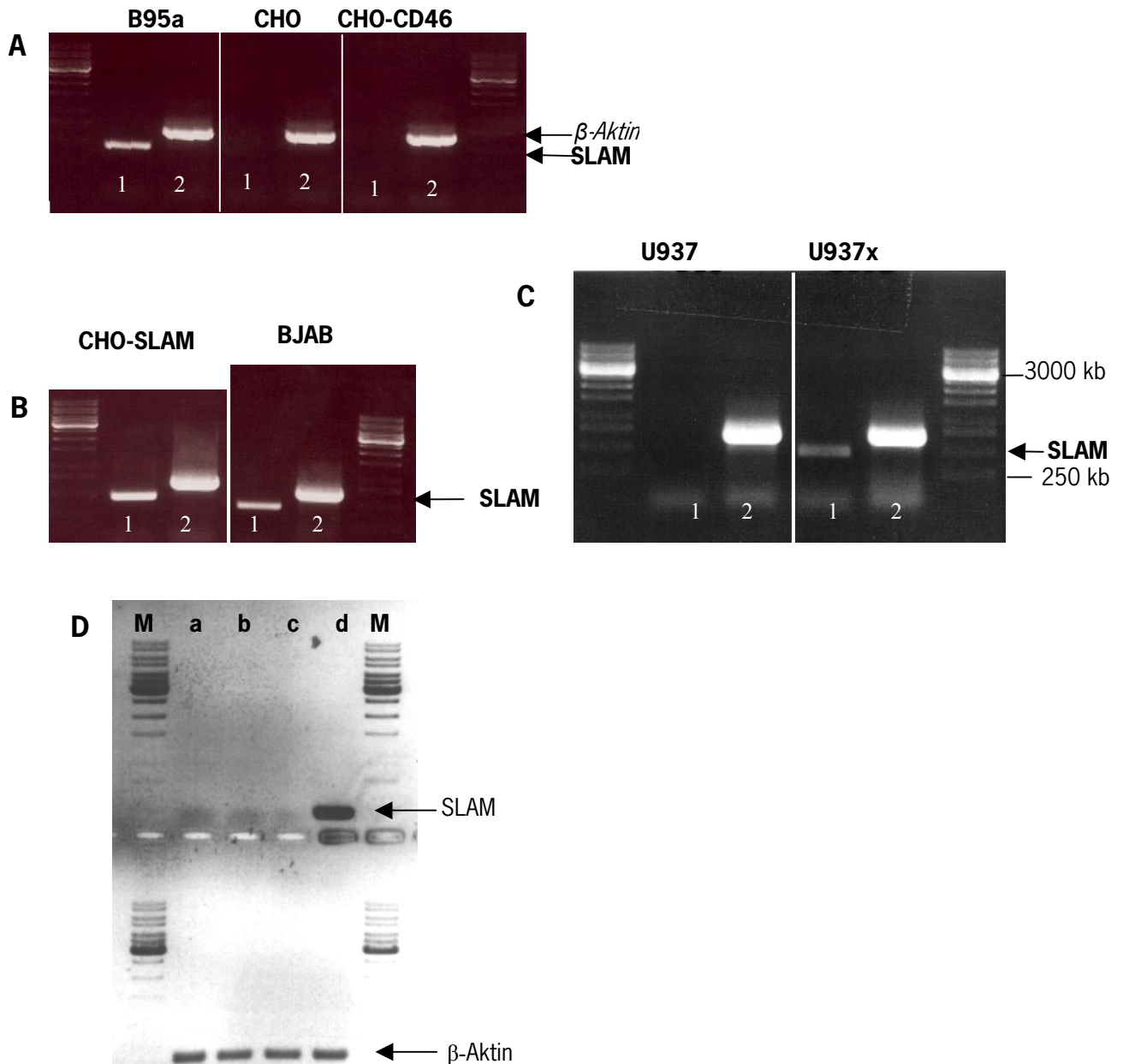


Abb. 4-17 SLAM RNA Expression verschiedener Zelllinien. Aus $5 \cdot 10^6$ Zellen wurde über RNeasy Mini Kid (Qiagen) die RNA isoliert und revers transkribiert. Als Primer wurden die SLAM-Primer S1 und D1 verwendet. Bei SLAM Expression wird eine Bande von 441 bp amplifiziert (1). Zur Kontrolle wurden gleichzeitig β -Aktin Primer verwendet (2). Dargestellt sind die PCR-Ergebnisse der Zell-Linien B95a, CHO, CHO-CD46 (A); CHO-SLAM und CHO (B); U937 und U937x (C), sowie in (D) Vero (a), Jurkat (b) HeLa (c) und CHO-SLAM (d).

4.4 Bindung von WTFb und Edm an SLAM-transduzierte CHO-Zellen

CD46 ist als Rezeptor für MV-Impfviren bekannt. Nach der Identifizierung von SLAM als Rezeptor stellt sich die Frage, wie sich die Bindungsstärke der Wildtypviren im Vergleich zum Impfstamm verhält. Dazu wurden CHO-Zellen, sowie die selektierten CHO-SLAM-Zellen aber auch CHO-CD46 exprimierende Zellen mit steigender Virusmenge inkubiert und die Virusbindung über Markierung mit L77 Antikörper sowie FITC Zweitantikörper im FACS festgestellt (**Abb. 4-18**). Bei CHO Zellen ist nur eine schwache Hintergrund Bindung vorhanden, weshalb die Ergebnisse jeweils auf die Bindung der CHO-Zellen normalisiert wurden. CHO-SLAM Zellen haben die Fähigkeit sowohl Wildtyp als auch Impfviren zu binden. Die Bindung von WTFb an SLAM liegt deutlich über derjenigen von Edm an SLAM. Sie ist jedoch schwächer, als die Bindung von Edm an CD46. Der Impfstamm Edm band mit hoher Affinität an CHO-CD46 Zellen und mit einer geringeren Affinität auch an CHO-SLAM Zellen, wohingegen der Wildtyp Stamm WTFb nur CHO-SLAM Zellen binden konnte.

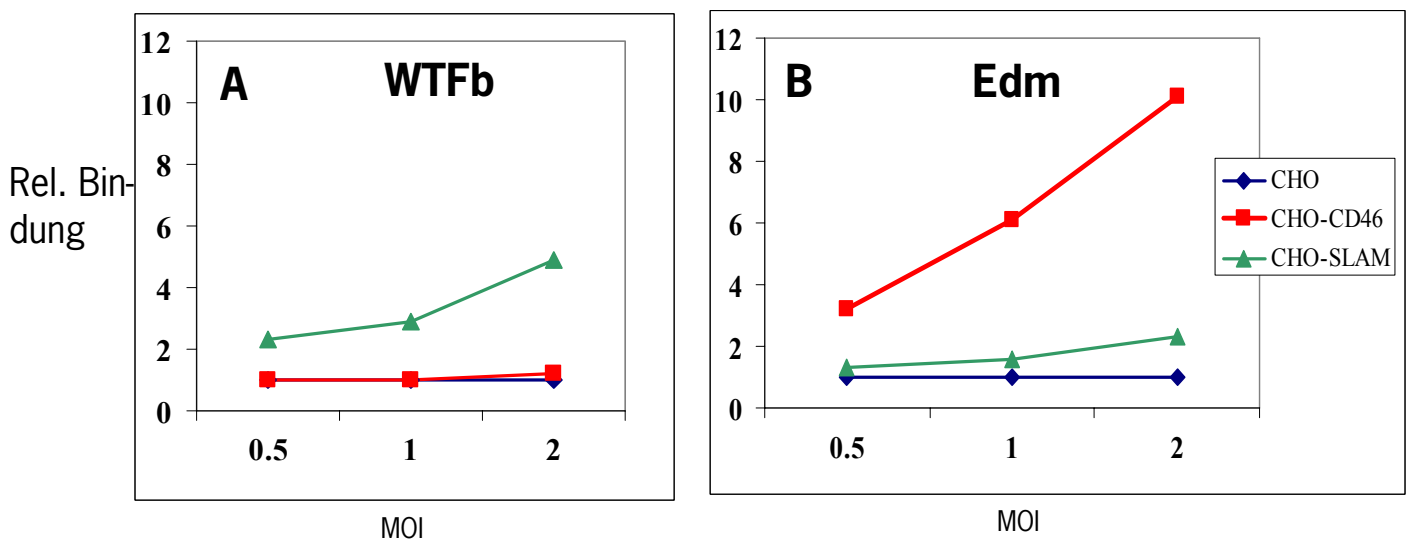


Abb. 4-18 Virusbindungssassay. CHO-, CHO-SLAM- und CHO-CD46- Zellen wurden mit steigender Virusmenge (MOI= 0,5 ; 1 und 2) von WTF (**A**) und Edm (**B**) inkubiert und gebundenes Virus wurde im Durchflusszytometer analysiert.

4.5 Synzytienbildung von CHO-SLAM Zellen nach Infektion mit WTFb oder Edm

In 4.4 konnte gezeigt werden, dass sowohl WTFb als auch Edm an CHO-SLAM Zellen binden können. Dies gibt jedoch noch keinen Hinweis auf die Replizierfähigkeit der Viren innerhalb der selektierten Zellen. Für CHO Zellen im Allgemeinen ist bekannt, dass sie bei Expression von CD46 Edm replizieren und eine Synzytienbildung auslösen.

CHO Zellen als Kontrolle, sowie CHO-SLAM Zellen wurden mit MV WTFb oder Edm inkubiert (MOI = 1). Wie **Abb. 4-19** zeigt, bilden die CHO-SLAM Zellen nach Infektion mit WTFb große Synzytien (**B**). Die CHO Ursprungszelllinie (**A**) zeigt keine Synzytienbildung nach Inkubation mit WTFb. Auch nach Inkubation mit Edm sind Synzytien zu erkennen (**D**), die jedoch bei gleicher Inkubationszeit kleiner ausfallen, als nach Infektion mit WTFb. Die Daten zeigen, dass SLAM die virale Bindung, Aufnahme und Synzytienbildung vermittelt. SLAM ist damit ein Rezeptor für sowohl Wildtyp, als auch Impfstamm MV.

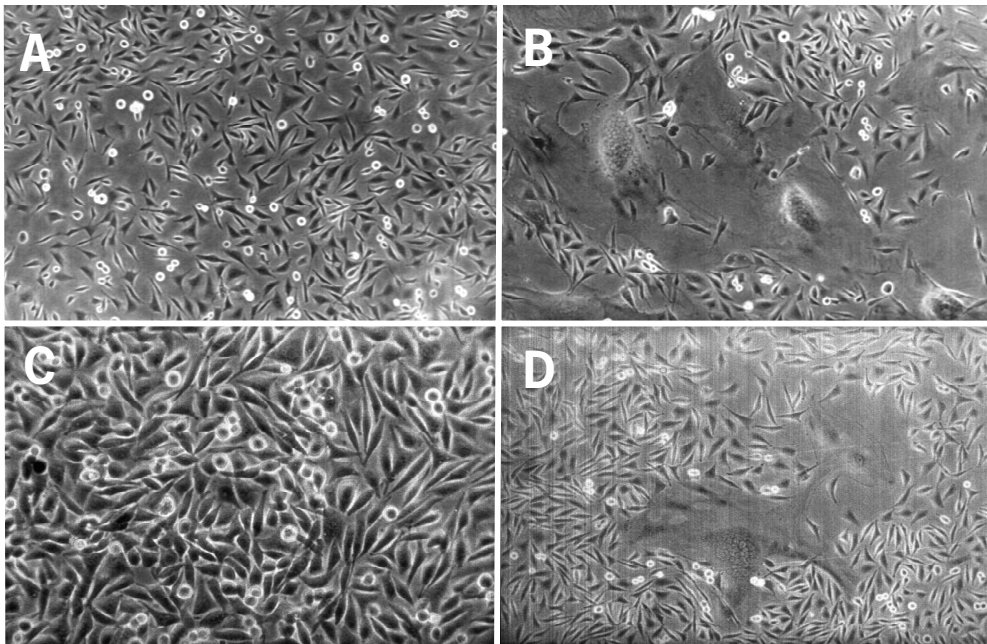


Abb. 4-19 Synzytienbildung auf CHO-SLAM Zellen nach Infektion mit WTFb und Edm. CHO-SLAM Zellen (**B, D**) sowie CHO- Zellen (**A, C**) wurden mit MV WTFb (**A, B**) oder MV Edm (**C, D**) über 48 Std. mit einer MOI von 1 inkubiert und die Synzytienbildung im Mikroskop beobachtet.

4.6 Infektion und Replikation von WTFb auf CHO-SLAM-Zellen

In den bisherigen Versuchen wurde ausschließlich auf Bindung oder Synzytienbildung getestet, was jedoch keine Aussage über die tatsächliche Replikation der Viren innerhalb der Zellen macht. Das während der viralen Replikation am stärksten exprimierte Protein ist das N-Protein. Deshalb wurde nach Inkubation der CHO-SLAM Zellen mit WTFb die intrazelluläre Anreicherung des N-Proteins beobachtet (**Abb. 4-20**).

CHO Zellen (**A**) sowie CHO-SLAM Zellen (**B**) wurden auf Chamber Slides kultiviert und mit MV (WTFb MOI 0,2) für 48 Std. inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit PFA fixiert und mit Triton-X 100 Puffer permeabilisiert. Das N-Protein wurde mit AK F227 (2 µg/µl) markiert. Nach Inkubation mit dem fluoreszierenden Zweitantikörper Alexa 488 (Verdünnung 1:400) konnte die Verteilung des N-Proteins im Fluoreszenzmikroskop beobachtet werden.

Während auf CHO Zellen nur eine schwache Hintergrundfluoreszenz zu finden ist (A) (die Punkte in A sind vermutlich nicht aufgenommene Viruspartikel), zeigen die CHO-SLAM Zellen eine deutliche Neusynthese des N-Proteins in den Synzytien. Dabei ist auch die typische Anreicherung des N-Proteins um die Zellkerne herum zu beobachten.

Dies zeigt, dass SLAM neben der Bindung und Aufnahme von WTFb auch die Replikation vermittelt.

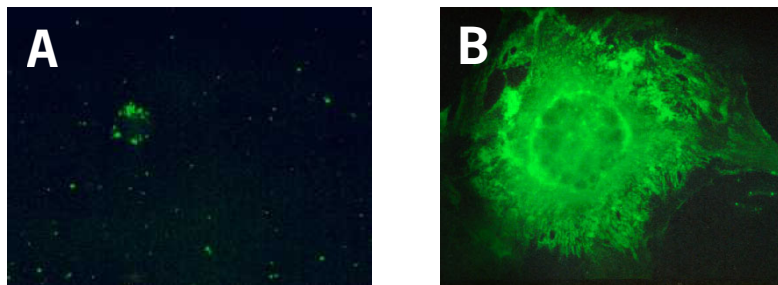


Abb. 4-20 Replikation von WTFb in CHO-SLAM Zellen. CHO Zellen (**A**) sowie CHO-SLAM Zellen (**B**) wurden auf Chamber Slides kultiviert und mit MV (WTFb MOI 0,2) für 48 Std. inkubiert und anschließend mit Triton-X 100 permeabilisiert. Das MV N-Protein wurde mit den Antikörpern F227 sowie Alexa 488 intrazellulär markiert.

4.7 Rezeptorbenutzung verschiedener Masernvirusstämme

Ob Wildtyp MV *in vivo* mit CD46 als Rezeptor interagieren und ob alle MV-Stämme SLAM als Rezeptor benutzen können, war bis dahin unbekannt. Für ein Verstehen der MV Pathogenese ist dies jedoch von entscheidender Bedeutung. Es wurde beschrieben, dass klinische Isolate wie JW und IV mit geringer Affinität an CD46 binden. Die Infektion von PBMCs der Isolate FV93 und BCL94 kann dagegen nicht durch CD46 Antikörper gehemmt werden (Manchester *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass MV Wildtypen aus Speichelproben akut infizierter Patienten, SLAM als Rezeptor verwenden (Ono *et al.*, 2001a). Aus diesem Grund wurde die Rezeptorbenutzung zahlreicher klinischer Isolate, Stämme und rekombinanter Viren untersucht, die im Labor verfügbar waren.

Um die Rezeptorbenutzung zu testen, wurden vier verschiedene Zell-Linien mit MV inkubiert und anschließend die Zellen auf Infektion untersucht. B95a Zellen dienten als Positivkontrolle, da sie bekanntermaßen durch alle MV Stämme infiziert werden können. CHO Zellen dienten als Negativkontrolle. Zur Unterscheidung der Rezeptorbenutzung zwischen SLAM und CD46 wurden CHO Zellen verwendet die ausschließlich CD46 exprimieren sowie die selektierten CHO SLAM Zellen. Durch den Vergleich der CHO-CD46-, CHO-SLAM- und CHO-Zellen ist ein direkter Vergleich der Rezeptorbenutzung vor dem selben zellulären Hintergrund möglich.

Die Zellen wurden dazu auf Chamber-slides ausgesät und bei ca. 80 % Konfluenz einmal mit PBS gewaschen. Das entsprechende Virus wurde in serumfreien Medium verdünnt und anschließend in 400 µl und einer MOI von 0,1 auf die Zellen gegeben. 2 Tage nach Infektion wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit dem monoklonalen Antikörper F227 gegen das MV-Nukleokapsid Protein gefärbt. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper Alexa 488 anti-Maus IgG wurde die Infektionsanalyse im Immunfluoreszenzmikroskop durchgeführt.

Abb. 4-21 bis **Abb. 4-24** zeigen einige der Fluoreszenzaufnahmen für MV Impfstämme, Wildtypstämme sowie rekombinanter Viren. **Tabelle 4-1** fasst die Ergebnisse aller getesteten Viren zusammen.

Alle MV-Stämme, Isolate und rekombinante Viren infizierten B95a- Zellen und CHO-SLAM Zellen. Das bedeutet, dass alle Viren SLAM als Rezeptor verwendeten. CD46 diente zusätzlich zu SLAM als Rezeptor für einige Impfstamm-Viren wie Edm, Edm-Zagreb, Aik-C und genetisch ähnlich Stämmen. (**Tabelle 4-1** Nr.1-6). Aber auch Laborstämme, die auf Vero- Zellen passagiert wurden, verwenden CD46 als Rezeptor (**Tabelle 4-1** Nr 7-11). Dies gilt auch für Wildtyp Isolate wie Chicago-1 (**Abb. 4-21**) EBL, EBT und Kohno (**Tabelle 4-1** Nr. 12-15) die auf Vero- Zellen passagiert wurden. Auch

hier sind Synzytien sowohl auf den CD46 exprimierenden Zellen, als auch auf CHO-SLAM Zellen zu finden. Keines der getesteten Viren verwendet ausschließlich CD46 als Rezeptor.

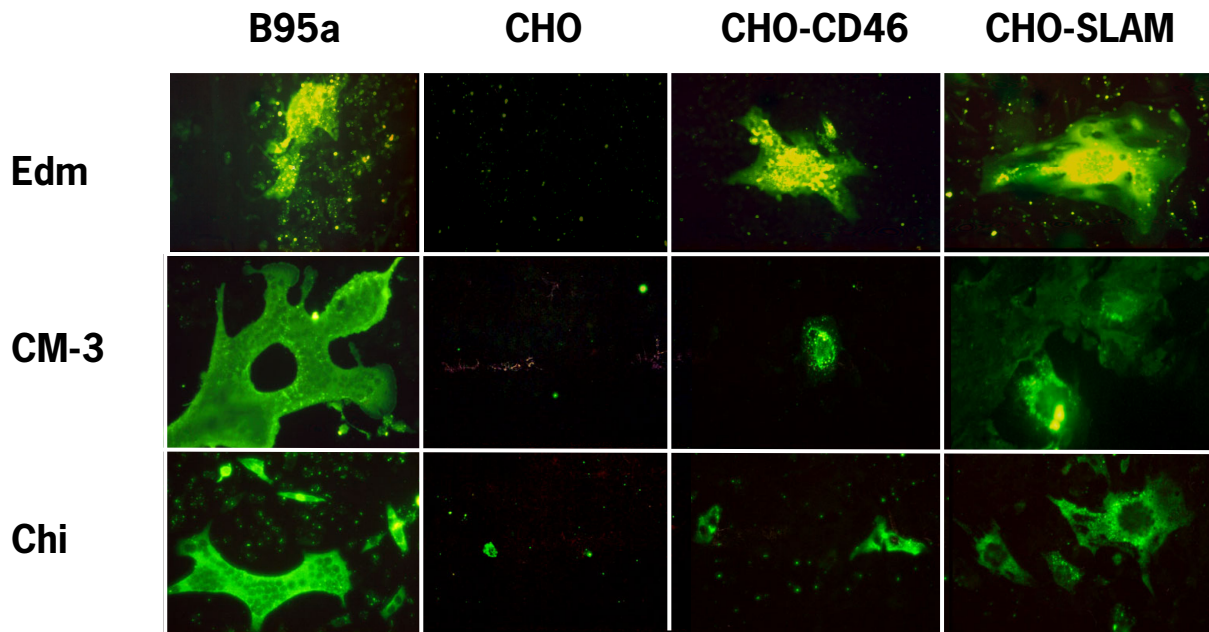


Abb. 4-21 Synzytien Formation auf B95a, CHO, CHO-CD46 und CHO-SLAM Zellen nach Infektion mit MV Impfstämme. Gezeigt sind die Fluoreszenzaufnahmen für die Stämme Edm, CM-3 sowie Chi. Die Zellen wurden mit Virus infiziert (MOI 0,1) und nach 2 Tagen fixiert und permeabilisiert. Das MV Nukleocapsidprotein wurde mit mAK F227 und Alexa 488 konjugierten Zweitantikörpern markiert. Vergrößerung 40x.

Die meisten der Wildtypisolate, die auf B-Zell Linien wie BJAB oder B-LCL Zellen, die sowohl CD46 als auch SLAM exprimieren, gezüchtet wurden, verwendeten ausschließlich SLAM als Rezeptor. Eine einzige Ausnahme zeigte das Isolat BIL (**Tabelle 4-1 Nr. 16**), das auch mit CD46 interagiert und hier kleine Synzytien auf den CHO-CD46-Zellen ausbildet, die aus nur zwei infizierten Zellen und auch Einzelzellen besteht. Bedeutend größere Synzytien sind allerdings auf den CHO-SLAM Zellen zu erkennen mit teilweise über 30 Zellkernen.

Das Wildtyp-Isolat WTFb das auf BJAB Zellen gezüchtet wurde, infizierte ausschließlich CHO-SLAM Zellen (**Abb. 4-22**). Der MV-Stamm WTFv infiziert sowohl CHO-CD46, als auch CHO-SLAM Zellen (**Abb. 4-22**). WTFv kann also beide Proteine als Rezeptor verwenden.

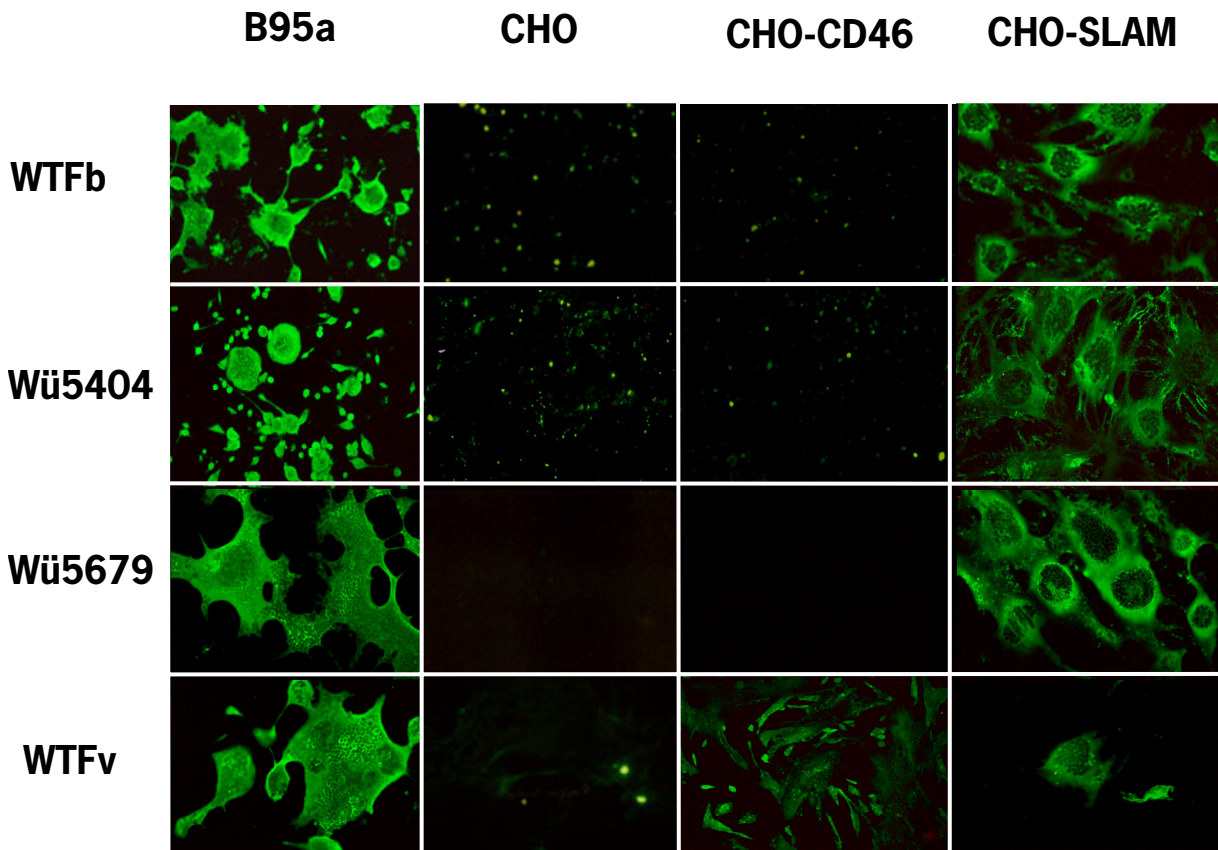


Abb. 4-22 Synzytienbildung auf B95a, CHO, CHO-CD46 und CHO-SLAM Zellen nach Infektion mit MV Wildtyp. Gezeigt sind die Fluoreszenzaufnahmen für die Stämme WTFb und WTFv, sowie den Würzburg-Isolaten Wü5404 und Wü5679. Die Zellen wurden mit Virus infiziert (MOI 0,1) und nach 2 Tagen fixiert und permeabilisiert. Das MV Nukleokapsidprotein wurde mit mAK F227 und Alexa 488 konjugierten Zweitantikörpern markiert. (Vergrößerung 40x)

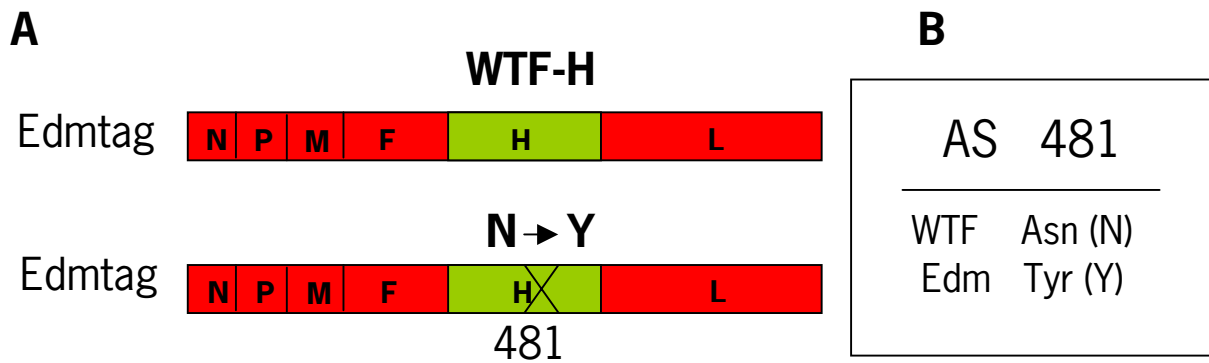


Abb. 4-23 Genomaufbau der rekombinanten Viren. Bei MV (WTF-H)Edm (**A, oben**) wurde in einen Edm Hintergrund das H-Protein des WTFb eingesetzt. An AS Stelle 481 (Nukleotidaustausch an 1441 von A zu T) befindet sich bei WTFb ein Asparaginrest (**B**). Bei Edm ein Tyrosinrest. Das Genom des rekombinanten Virus MV (WTF-H 481 N-Y) Edm (**A, unten**) enthält einen Edm Hintergrund sowie das WTF-H Protein. An Stelle 481 wurde die AS Asparagin des WTF gegen das Tyrosin des Edm ausgetauscht.

Getestet wurden zudem rekombinante Viren, die genau definierte Hüllproteine exprimieren. Den Hintergrund bilden die viralen Proteine des Edm Virus (Edm tag). Edm tag (**Tabelle 4-1 Nr. 24**) exprimiert alle viralen Proteine, wie auch das F und H Protein des Edm Virus (Radecke *et al.*, 1995). Das MV (WTF-F/H) (**Nr.25**) exprimiert das F und H Protein von WTFb Stammes. Von besonderer Bedeutung ist der Vergleich der Mutanten mit Austausch des Edm H-Proteins gegen das WTF-H Protein (**Abb. 4-23**). Das rekombinante Virus MV (WTF-H) Edm exprimiert das H Protein von WTFb. Die Rekombinante MV (WTF-H 481 N-Y)Edm enthält ebenfalls das H-Protein des WTF. Eine Punktmutation an Nukleotid Position 1441 von Adenin zu Tymidin führt jedoch zu einem Aminosäurewechsel vom WTF Asparagin zu Edm Tyrosin (Johnston *et al.*, 1999). Diese Mutation ermöglicht die Interaktion des Virusproteins mit CD46. Die Rekombinanten (**Nr.24-26**) die das Edm H exprimieren infizierten sowohl CHO-CD46 als auch CHO-SLAM Zellen. Im Gegensatz dazu infizierten die rekombinanten Viren mit WTF-H Protein (**Nr.25 und 27**) ausschließlich SLAM exprimierende Zellen. Die Punktmutation der Rekombinante MV(WTF-H 481 N-Y)Edm (**Nr.28**) mit Mutation an AS Position 481 von WTF-H zu Edm-H bewirkt eine Veränderung in der Rezeptorbenutzung. Neben der Infektion von CHO-SLAM Zellen wurden zudem die CHO-CD46 Zellen infiziert (**Abb. 4-24**).

Damit konnte gezeigt werden, dass die Punktmutation im infektiösen Virus eine Veränderung in der Rezeptorbenutzung hervorruft.

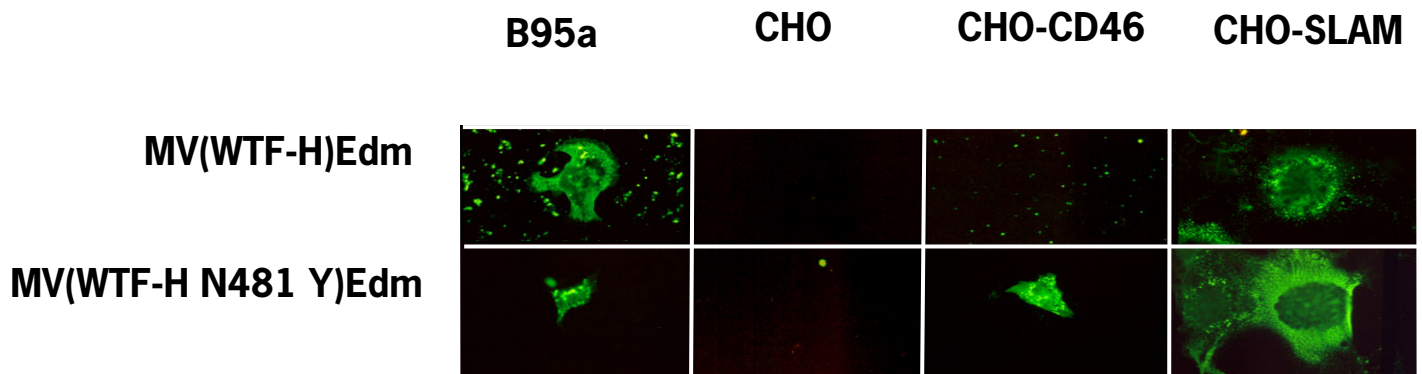


Abb. 4-24 Synzytzenbildung auf B95a, CHO, CHO-CD46 und CHO-SLAM Zellen nach Infektion mit rekombinanten MV. Gezeigt sind die Fluoreszenzaufnahmen für MV (WTF-H) Edm sowie MV WTF-H N481 Y)Edm. Die Zellen wurden mit Virus infiziert (MOI 0,1) und nach 2 Tagen fixiert und permeabilisiert. Das MV Nukleokapsidprotein wurde mit mAK F227 und Alexa 488 konjugierten Zweitantikörpern markiert. (Vergrößerung 40x)

Nr.) Stamm	B95a	CHO	CHO-CD46	CHO-SLAM
1) Edm	+	-	+	+
2) Edm-Zagreb	+	-	+	+
3) Aik-C	+	-	+	+
4) Hallé	+	-	+	+
5) EDW3	+	-	+	+
6) ELV-4	+	-	+	+
7) JOY-4	+	-	+	+
8) Mantooth	+	-	+	+
9) Braxator	+	-	+	+
10) LEC-12	+	-	+	+
11) CM-3	+	-	+	+
12) Chi- 1	+	-	+	+
13) EBL	+	-	+	+
14) EBT	+	-	+	+
15) Kohno	+	-	+	+
16) BIL	+	-	+	+
17) Wü4797	+	-	-	+
18) Wü5404	+	-	-	+
19) Wü7671	+	-	-	+
20) Wü7678	+	-	-	+
21) Wü5679	+	-	-	+
22) WTFb	+	-	-	+
23) WTFv	+	-	+	+
24) Edtag	+	-	+	+
25) MV(WTF-F/H)Ed	+	-	-	+
26) MV(WTF-F)Ed	+	-	+	+
27) MV(WTF-H)Ed	+	-	-	+
28) MV(WTF-H481N-Y)Ed	+	-	+	+

Tabelle 4-1 Infektion von B95a, CHO, CHO-CD46 und CHO-SLAM Zellen mit verschiedenen MV Stämmen. Mit (+) markierte Zellen wurden durch das entsprechende Virus infiziert, bei (-) hat keine Infektion stattgefunden.

4.8 SLAM Downregulation von der Zelloberfläche

SLAM ist ein kostimulatorisches Molekül. Die Virus-SLAM Interaktion könnte deshalb die Stimulation von Leukozyten behindern und so die Immunsuppression während der akuten Masernviruserkrankung fördern. Dies könnte durch Blockierung des kostimulatorischen Signals geschehen, aber auch durch Induktion eines negativen Signals das durch SLAM ausgelöst wird. Die Bindung des Virus an die Zelle könnte die Bindung des natürlichen Liganden, also eines anderen SLAM Moleküls hemmen. Daher wurde getestet, ob SLAM von der Zelloberfläche nach Viruskontakt herunterreguliert wird.

4.8.1 SLAM wird nach Infektion mit WTFb von der Zelloberfläche herunterreguliert

Deutliche Hinweise auf eine Downregulation gab die konfokale Mikroskopie von CHO-SLAM Zellen (**Abb. 4-25**). $5 \cdot 10^4$ CHO-SLAM Zellen wurden auf Chamber Slides ausgesät und bis zu 80 % Konfluenz bei 37°C in MEM 10 % FKS inkubiert. Anschließend wurde ein Teil der Zellen mit MV WTFb, MOI=0,5 für 2 Stunden infiziert. Nach 48 Std. wurden die Zellen mit PBS gewaschen (s. Färbung von Chamber-slides) und mit PHA fixiert. Die Markierung erfolgte mit mAK 5C6 sowie FITC Zweitantikörper. Bei normaler Hellfeld Beleuchtung erkennt man deutlich die Einzelzellen bei den uninfizierten CHO-SLAM Zellen (**Abb. 4-25 A**). Nach Virusinfektion erkennt man die starke Synzytienbildung (**Abb. 4-25 C**).

Im Fluoreszenzlicht zeigt sich die gleichmäßige Verteilung von SLAM an der Zelloberfläche (**Abb. 4-25 B**). Nach Infektion und folgender Synzytienbildung ist kein SLAM auf der Zelloberfläche zu finden (**Abb. 4-25 D**). SLAM ist also vollständig von der Zelloberfläche herabreguliert worden.

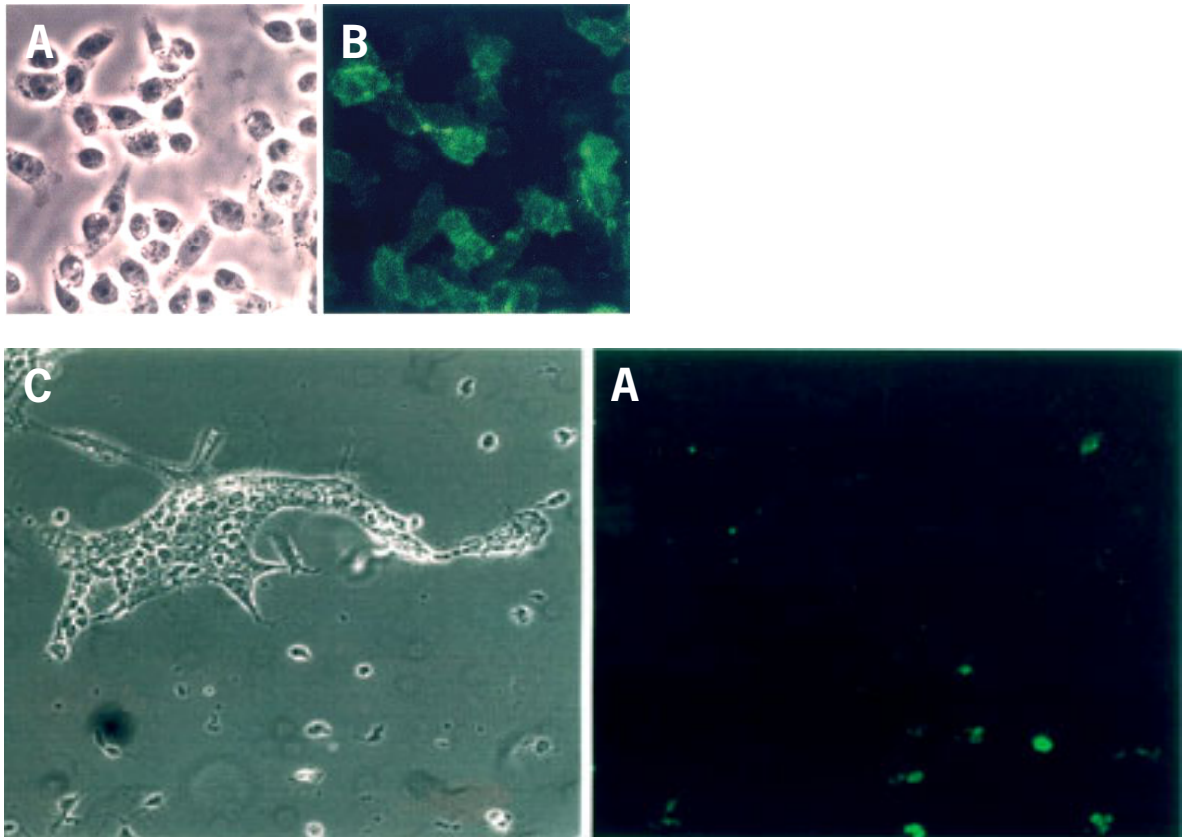


Abb. 4-25 Konfokal Aufnahme CHO-SLAM Zellen vor und nach Infektion mit WTFb. $5 \cdot 10^4$ CHO-SLAM Zellen wurden auf Chamber-slides ausgesät. Ein Teil der Zellen wurde mit MV WTFb, MOI=0,5 für 2 Stunden infiziert (**C, D**), während der andere Teil der Zellen unbehandelt blieb (**A, B**). Nach 48 Std. wurden die Zellen mit PBS gewaschen (s. Färbung von Chamber-slides) und mit PHA fixiert. Die Markierung erfolgte mit mAK 5C6 sowie FITC Zweitantikörper.

4.8.2 SLAM Downregulation von der Oberfläche von BJAB-Zellen nach Infektion mit WTFb

BJAB Zellen sind B-Zellen und exprimieren eine ausreichende Menge an SLAM, um eine Downregulation zu überprüfen. $5 \cdot 10^4$ BJAB Zellen wurden in 5 ml FACS-Röhrchen überführt und mit PBS gewaschen. 3 Proben blieben als Kontrolle uninfiziert, zwölf weitere wurden mit WTFb für 2 Stunden und einer MOI von 0,5 infiziert und anschließend für 24 Std. bei 37 °C inkubiert. Die Infektion wurde mit mAK L77 anti-MV-H kontrolliert. In (Abb. 4-26) ist die MFI von jeweils 3 Proben angegeben. Der MFI-Wert bei Markierung mit L77 liegt sehr deutlich über dem der anderen Proben und gibt damit die gute Infektion der Zellen an. SLAM wurde mit mAK 5C6 markiert. Der MFI-Wert liegt bei uninfizierten Zellen bei ca. 350. Nach Infektion der Zellen sinkt der Wert auf ca. 110 was dem Wert der Isotypkontrolle entspricht. SLAM wurde demnach fast vollständig von der Zelloberfläche der BJAB-Zellen herunterreguliert.

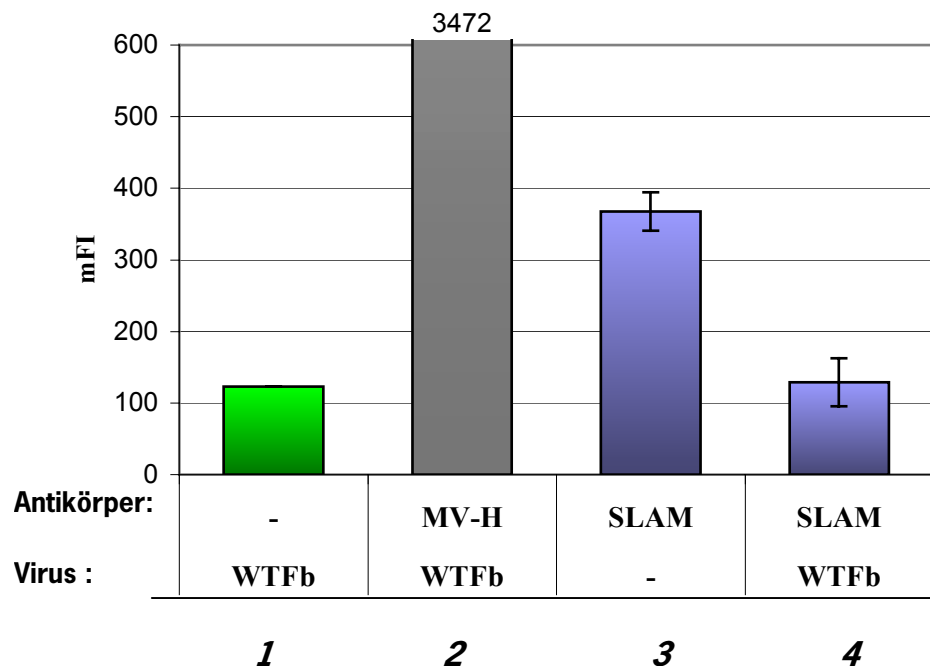


Abb. 4-26 SLAM Downregulation von der Oberfläche von BJAB Zellen nach Infektion mit WTFb. BJAB Zellen wurden mit WTFb infiziert (**1,2,4**) und nach 24h mit Isotypkontrolle (**1**), anti MV-H AK (**2**) oder anti-SLAM AK (**3,4**) markiert. Angegeben ist die MFI aus drei Proben.

4.8.3 SLAM Downregulation von der Oberfläche von PBL

$1 \cdot 10^7$ Zellen wurden in RPMI 10 % FKS mit PHA ($2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$) stimuliert. Zur Infektion der Zellen wurden diese über 2 Std. mit WTFb MOI 0,1 in 500 μl serumfreien Medium inkubiert. Nach den 2 Std. wurde auf 10 ml RPMI 10 % FKS aufgefüllt. Auch hier wurde eine PHA-Konzentration von $2,5 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ beibehalten.

Pro Ansatz wurden nach 24 Std. $5 \cdot 10^4$ Zellen in FACS-Röhrchen überführt. Nach Fixieren der Zellen mit PFA 4 % folgte eine 45 minütige Inkubation mit dem entsprechenden Erstantikörper sowie 45 min Inkubation mit Alexa 488 Antikörper. Als Erstantikörper wurde neben einer Isotypkontrolle entweder das MV-H Protein markiert (mAK L77), CD69 (αCD69) oder SLAM (mAK 5C6).

Abb. 4-27 zeigt die MFI von PBL, die entweder unstimuliert vorlagen, stimuliert mit PHA oder sowohl stimuliert als auch infiziert wurden.

Die SLAM Isotypkontrolle gibt erwartungsgemäß nur eine leichte Hintergrund-Fluoreszenz. MV-H wird nur nach Stimulation mit anschließender Infektion exprimiert (schwarze Balken). CD69 dient als Stimulationsmarker (grüne Balken) und wird nicht exprimiert auf unstimulierten PBL. Nach Stimulation mit PHA steigt die CD69 Expression wie erwartet an.

SLAM wird auf unstimulierten PBL exprimiert. Nach 24 Std. Stimulation der Zellen mit PHA steigt die SLAM Expression stark an, die MFI hat sich von ca. 300 auf 700 mehr als verdoppelt. Nach Infektion der Zellen fällt die SLAM Expression jedoch deutlich ab. Es hat also eine Herabregulation von der Zelloberfläche stattgefunden. Die MFI entspricht nur $1/3$ derjenigen der unstimulierten Zellen und im Vergleich zu den stimulierten Zellen sogar nur $1/7$. **Abb. 4-27 B** zeigt die FACS-Kurven der stimulierten PBL im Vergleich zu den stimulierten und infizierten Zellen. Man erkennt deutlich die Verschiebung von den SLAM positiven PBL (rote Linie) zu den negativen PBL nach Infektion (grüner Bereich). SLAM wird also nach Infektion sowohl von der Oberfläche der B95a Zellen (Abschnitt 4.8.5) als auch von stimulierten PBL herabreguliert.

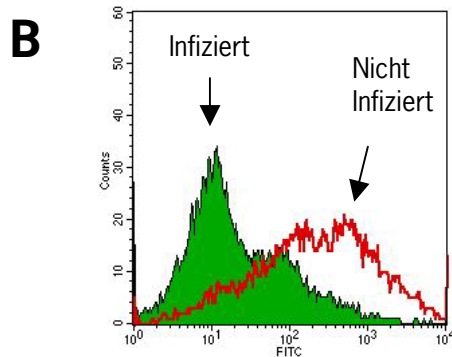
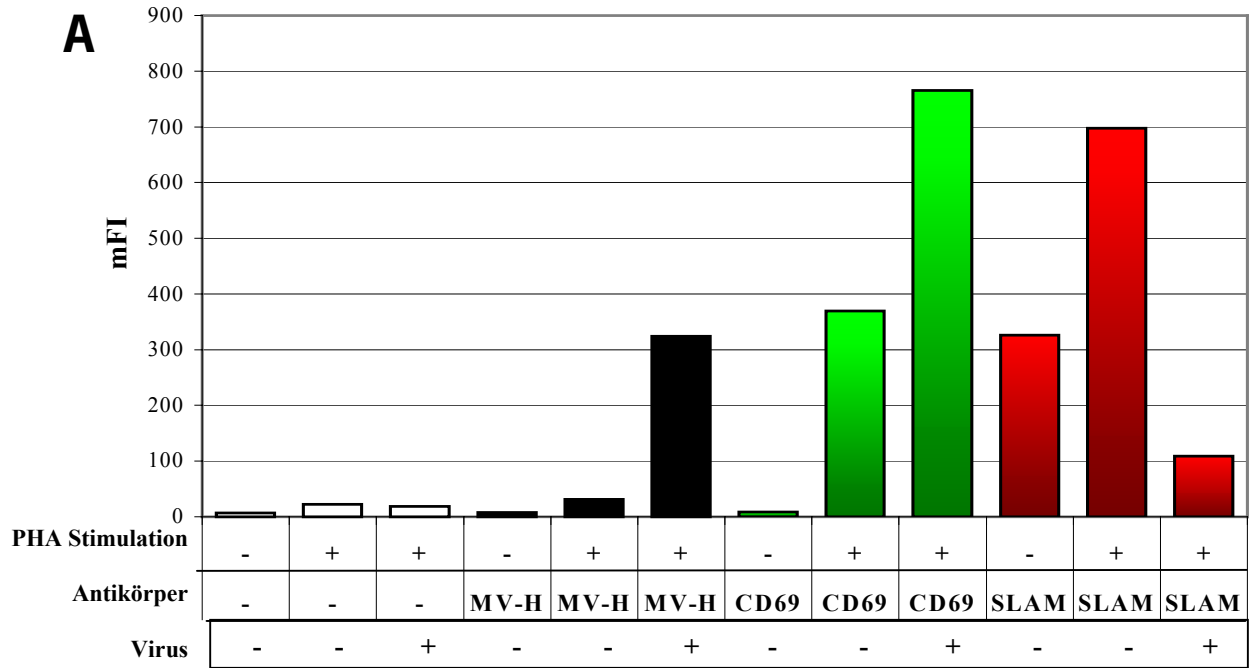


Abb. 4-27 Downregulation von SLAM von der Oberfläche von PBL. Als Erstantikörper wurde neben einer Isotypkontrolle (weiße Balken) entweder das MV-H Protein markiert (mAK L77) (schwarze Balken), CD69 (anti-CD69) (grüne Balken) oder SLAM (mAK 5C6) (rote Balken). Dargestellt ist die MFI von PBL, unstimuliert, stimuliert mit PHA oder sowohl stimuliert, als auch infiziert (**A**), sowie die FACS Diagramme der über 24 Std. stimulierten PBL im Vergleich zu stimulierten und über 24 Std. infizierten Zellen (MOI 0,1) (**B**).

4.8.4 SLAM Downregulation von der Zelloberfläche von CHO-SLAM Zellen nach Kontakt mit BJABpWTF-Zellen

In den Abschnitten 4.8.3 bis 4.8.5 konnte präsentiert werden, dass SLAM nach Infektion von der Zelloberfläche herunterreguliert wird. Danach stellt sich die Frage, ob die Infektion notwendig ist für eine Downregulation oder der Kontakt der viralen Proteine mit SLAM ausreicht.

Im FACS-Röhrchen wurden $5 \cdot 10^4$ CHO-SLAM Zellen im Verhältnis 1:1 mit BJABpWTF in RPMI 10 % FKS gemischt. BJABpWTF Zellen sind BJAB Zellen, die persistent mit WTF infiziert sind und somit die viralen Hüllproteine H und F exprimieren. Bis zur Messung wurde das Zellgemisch aus CHO-SLAM und BJABpWTF Zellen bei 37 °C inkubiert. Zu Zeitpunkten zwischen 0 und 24 Std. wurden die Zellen abzentrifugiert und mit PFA 4% fixiert. Bis zur Färbung wurden die fixierten Zellen mit RPMI 10 % FKS bei 4 °C aufbewahrt. Die Färbung erfolgte mit allen Zellen gleichzeitig. Nach Färbung mit anti-SLAM mAK 5C6 wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

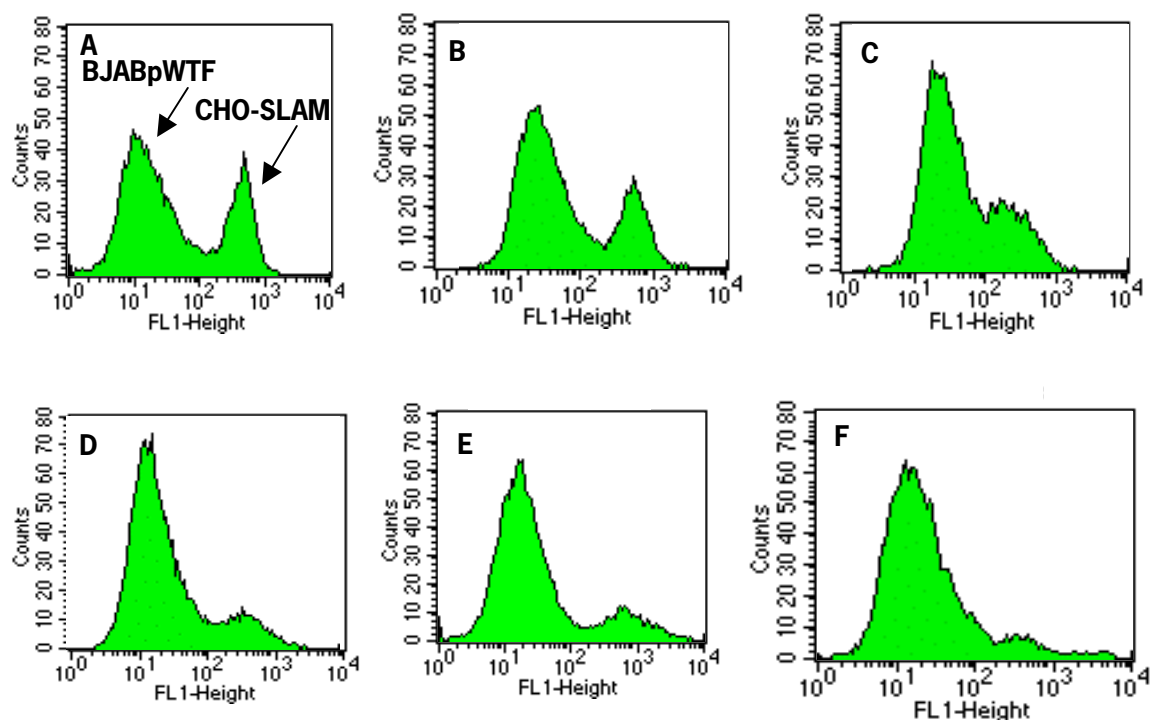


Abb. 4-28 Kontaktdownregulation von SLAM von der Oberfläche von CHO-SLAM Zellen. $5 \cdot 10^4$ CHO-SLAM Zellen im Verhältnis 1:1 mit BJABpWTF gemischt. Zu den Zeitpunkten zwischen 0 (A), 1 (B) 2(C), 4 (D) 6 (E) und 24 Stunden (F) wurden die Zellen mit PFA 4% fixiert und das SLAM Protein mit mAK 5C6 markiert. Dargestellt sind die FACS-Diagramme nach Analyse im Durchflusszytometer.

Zum Zeitpunkt 0 sind im FACS Diagramm deutlich zwei Peaks zu erkennen. Die persistent infizierten BJAB Zellen exprimieren kein SLAM und bilden den linken Peak, die CHO-SLAM Zellen sind deutlich

positiv, was an dem nach rechts verschobenen Peak erkennbar ist. Bereits nach 1 Stunde Inkubation wurde der Peak der positiven CHO-SLAM Zellen merklich kleiner. Nach zwei Stunden ist dieser Effekt deutlich verstärkt. Bereits nach 4 Stunden Inkubation ist der Peak der positiven CHO-SLAM Zellen fast verschwunden und bis zu 24 Stunden nach Inkubation ist nur eine leichte Hintergrundfluoreszenz zu erkennen. Der Kontakt der viralen Hüllproteine auf persistent infizierten BJAB Zellen reicht demnach aus, um SLAM von der Oberfläche der CHO-SLAM Zellen herunter zu modulieren.

4.8.5 SLAM Downregulation von der Oberfläche von B95a Zellen nach Kontakt mit BJABpWTFb

Nach CHO-SLAM Zellen wurde in einem weiteren Versuch die kontaktvermittelte Downregulation von SLAM auf B95a Zellen untersucht. $5 \cdot 10^4$ B95a Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit BJABpWTF in RPMI 10 % FKS gemischt. Zum Vergleich wurden außerdem B95a Zellen mit BJABpEdm, also BJAB Zellen, die persistent mit dem Impfstamm Edm infiziert wurden, durchgeführt. Bis zur Messung wurde das Zellgemisch aus B95a und BJABpWTF bzw. BJABpEdm Zellen bei 37 °C inkubiert. Zu Zeitpunkten zwischen 0 und 4 Std. wurden die Zellen abzentrifugiert und mit PFA 4% fixiert. Bis zur Färbung wurden die fixierten Zellen mit RPMI 10 % FKS bei 4 °C aufbewahrt. Die Färbung erfolgte mit allen Zellen gleichzeitig mit anti-SLAM mAK 5C6 und FITC gekoppeltem anti-Maus Zweitantikörper. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert.

In Abb. 4-29 **A** ist die absolute MFI dargestellt. BJABpWTFb exprimieren SLAM nicht (**1**). Die MFI liegt unter derjenigen der Isotypkontrolle (**3**). Auf BJABpEdm ist dagegen eine leichte SLAM Expression erkennbar (**2**). B95a Zellen zeigen sich deutlich SLAM positiv (**4**). Der deutlich geringere Mittelwert nach Mischen der Zellpopulationen (**5-8**) im Vergleich zu reinen B95a Zellen ist durch die Vermischung mit negativen Zellen zu erklären. Dennoch ist der Mittelwert zu Beginn der Versuchsreihe deutlich höher (**5**), als nach vier Stunden Inkubation (**8**). Zum Zeitpunkt 0 liegt der Mittelwert bei 40 und fällt im Verlauf der ersten 2 Stunden unter 30. Zwar ist auch nach 4 Stunden keine weitere Reduktion erkennbar, dennoch ist die Downregulation von SLAM auch auf B95a- Zellen bestätigt.

Dies zeigt insbesondere der Vergleich mit BJABpEdm. Hier ist eher ein leichter Anstieg der SLAM Expression zu finden Abb. 4-29 **B**.

Für eine Downregulation von SLAM von der Oberfläche der B95a Zellen ist also der Kontakt der WTFb Oberflächenproteinen ausreichend. Die Edm Oberflächenproteine bewirken keine Downregulation.

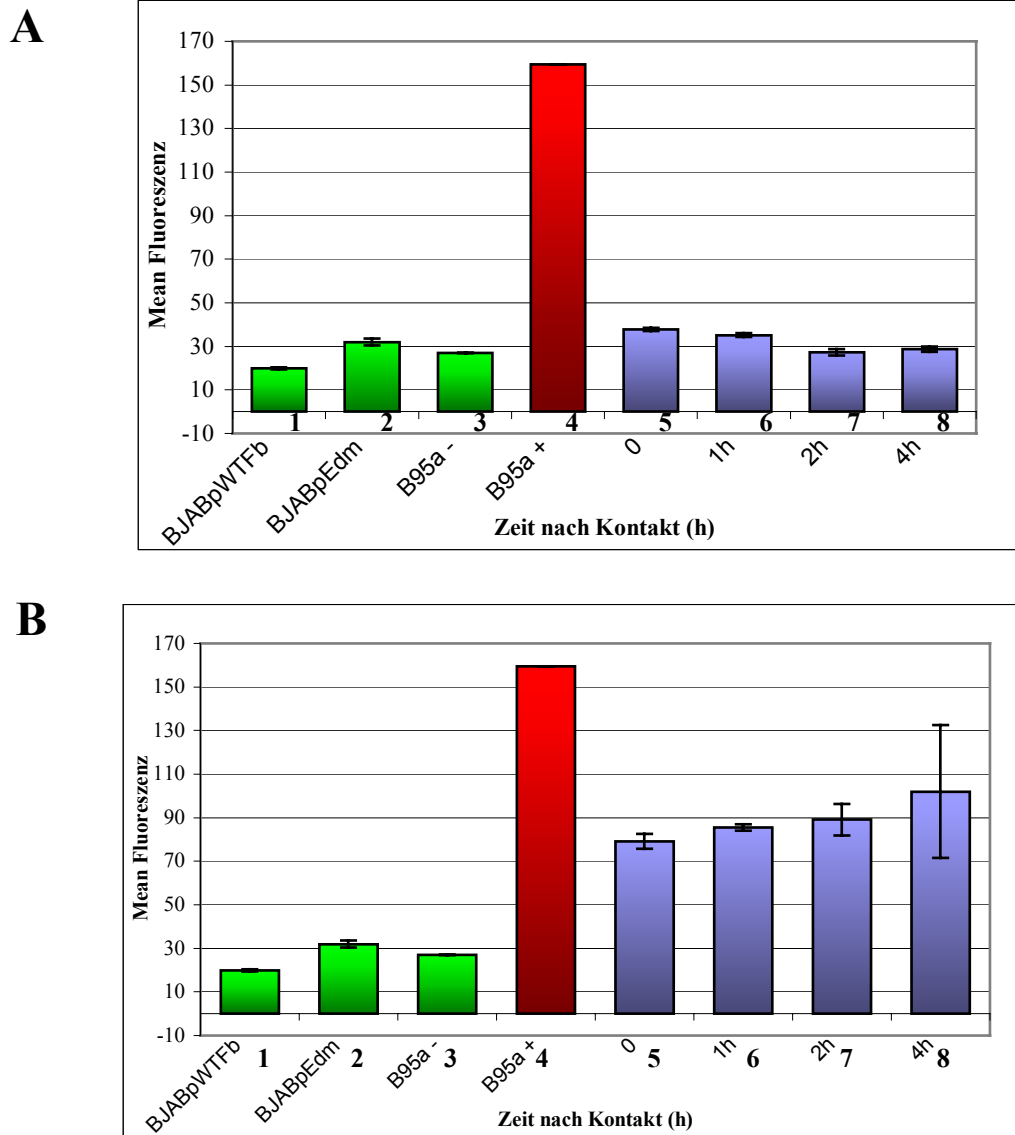


Abb. 4-29 Kontaktdownregulation von SLAM von der Oberfläche von B95a Zellen. B95a Zellen wurden im Verhältnis 1:1 mit BJABpWTF (A) oder BJABpEdm (B) gemischt. Zu Zeitpunkten zwischen 0 und 4 Std. PFA 4% fixiert (5-8). Die Färbung erfolgte mit allen Zellen gleichzeitig mit anti-SLAM mAK 5C6 und FITC gekoppeltem anti-Maus Zweitantikörper. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die MFI aus 3 Experimenten nach vier Zeitpunkten (5-8), sowie Messungen von BJABpWTF (1), BJABpEdm (2), und B95a mit Isotypkontrolle (3) oder 5C6 Antikörper (4).

4.8.6 SLAM Kontaktdownregulation von B95a Zellen nach Kontakt mit BJABpWTF in verschiedenen Verhältnissen

Im Verhältnis 1:1 bewirkt die Inkubation von BJABpWTF mit B95a Zellen eine deutliche Downregulation. **Abb. 4-30** zeigt die Downregulation bei verschiedenen Verhältnissen von B95a Zellen zu BJABpWTF. Wie in Abschnitt **4.8.6** wurden B95a Zellen gemeinsam mit BJABpWTF inkubiert. Im FACS-Röhrchen wurden $5 \cdot 10^4$ B95a Zellen im Verhältnis 1:1 bis 1:100 mit BJABpWTF in RPMI 10 % FKS gemischt. Bis zur Messung wurde das Zellgemisch aus B95a und BJABpWTF Zellen bei 37 °C inkubiert. Nach Inkubation von 4 Std. wurden die Zellen abzentrifugiert und mit PFA 4 % fixiert. Bis zur Färbung wurden die fixierten Zellen mit RPMI 10 % FKS bei 4 °C aufbewahrt. Die Färbung erfolgte mit allen Zellen gleichzeitig. Nach Färbung mit anti-SLAM mAK 5C6 wurden die Zellen im Durchflusszytometer analysiert.

Da pro Ansatz positive B95a Zellen mit negativen BJABpWTF in unterschiedlichen Verhältnissen untersucht wurden, wirkt sich dies auch auf den gesamten Meanwert aus. Nach Mischen der Zellen ist daher die MFI im Verhältnis 1:1 deutlich kleiner, als im Verhältnis 1:100. Deshalb wurde die Downregulation nach 4 Std. Inkubation bei 37°C jeweils im Vergleich zur Kontrolle zum Zeitpunkt 0 angegeben.

Im Verhältnis 1:1 ist eine deutliche Downregulation in der Veränderung der MFI von 150 auf 50 erkennbar. Eine deutliche Herabregulierung von SLAM konnte im Verhältnis 1:10 um 1/3 gezeigt werden. Auch im Verhältnis 1:20 und 1:40 ist eine deutliche Downregulation im Vergleich zum Nullwert zu erkennen. Erst im Verhältnis 1:80 und 1:100 hat keine Downregulation stattgefunden.

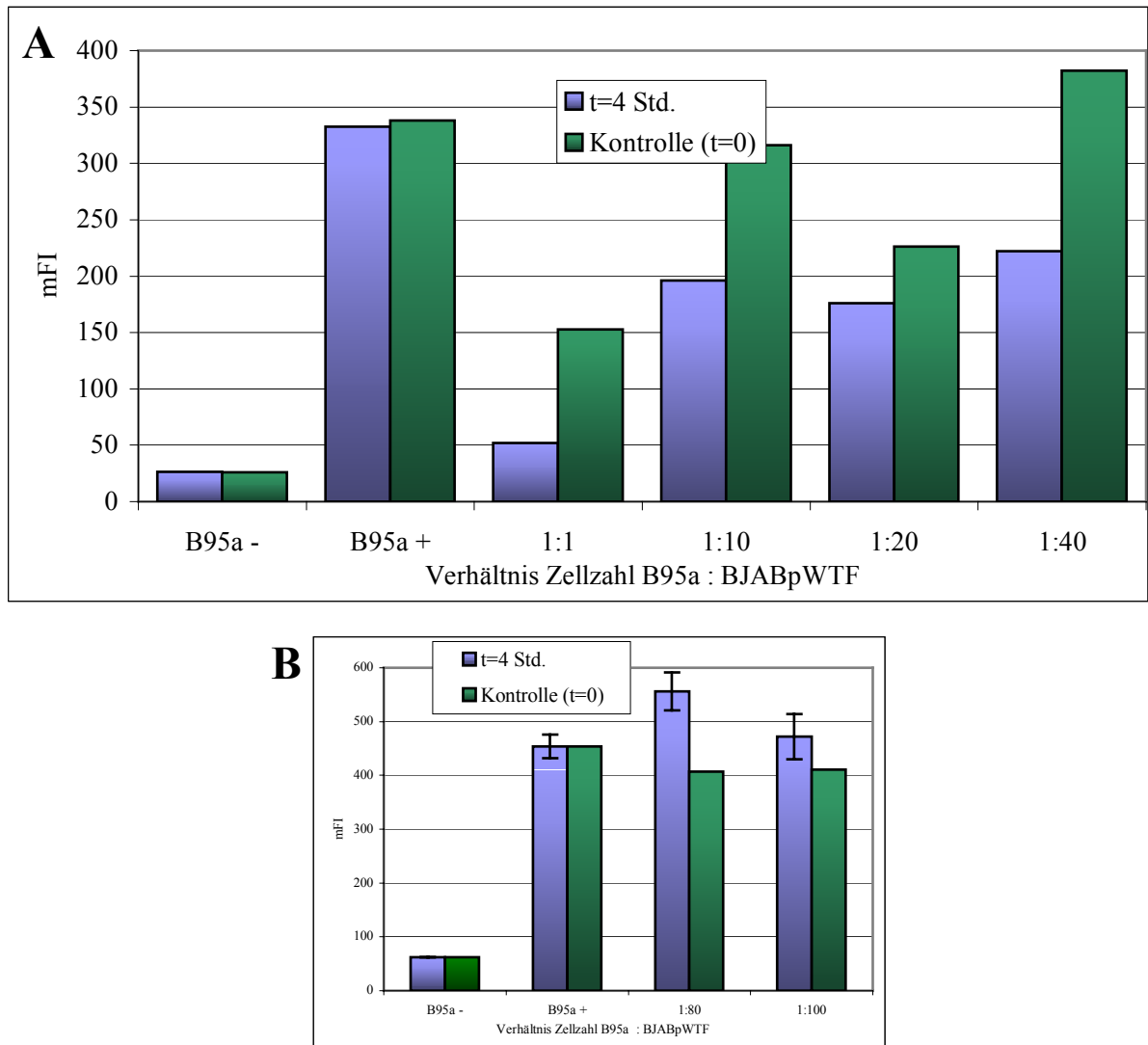


Abb. 4-30 Kontaktdownregulation von SLAM von der Oberfläche von B95a Zellen. B95a Zellen wurden im Verhältnis 1:1 bis 1:40 (A), 1:80 und 1:100 (B) mit BJABpWTF gemischt. Zu Zeitpunkten 0 und 4 Std. wurden die Zellen anti-SLAM mAK 5C6 gefärbt. Die Zellen wurden im Durchflusszytometer analysiert. Dargestellt ist die mittlere Fluoreszenz-Intensität (MFI) aus 3 Verdünnungsreihen. Zudem wurden B95a Zellen mit Isotypkontrolle (B95a-), sowie mit 5C6 (B95a+) markiert.

4.8.7 SLAM Downregulation von der B95a Zelloberfläche nach Kontakt mit UV inaktiviertem Virus

Nach Kontakt mit persistent infizierten BJAB Zellen wird SLAM von der Zelloberfläche von B95a Zellen und CHO-SLAM Zellen downreguliert. Um auszuschließen, dass es sich dabei um einen Effekt handelt, der durch die Mischung unterschiedlicher Zelltypen auftritt, wurde zusätzlich die SLAM Downregulation mit UV inaktiviertem, nicht replizierfähigem Virus untersucht.

MV WTFb wurde mit UV Licht $1,5 \text{ J/cm}^2$ inaktiviert. Zu $5 \cdot 10^4$ B95a Zellen wurde das inaktive Virus in der MOI von 2 entsprechenden Menge zugegeben und für eine Stunde bei $37 \text{ }^\circ\text{C}$ inkubiert. Nach 30 und 60 Minuten wurden die Zellen gefärbt, mit 5C6 anti-SLAM Antikörper markiert und die MFI im Durchflusszytometer bestimmt. **Abb. 4-31** zeigt die FACS Diagramme (A-C) sowie die Übersicht der MFI Werte.

Hintergrund-Fluoreszenz zeigt die Isotypkontrolle. Zum Zeitpunkt 0 liegt die MFI bei 45. Schon nach 30 Minuten liegt die SLAM Expression bei 15. nach 60 Minuten bei 8. Dies zeigt, dass auch durch UV inaktiviertes Virus eine SLAM-Modulation von der Zelloberfläche hervorgerufen wird. Es ist keine Replikation des Virus innerhalb der Zellen notwendig.

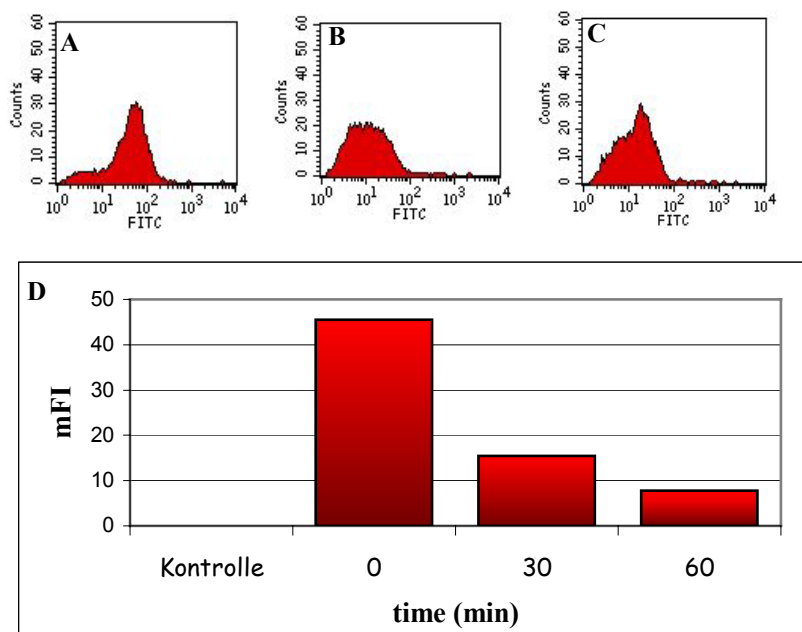


Abb. 4-31 SLAM Downregulation von der B95a Zelloberfläche nach Kontakt mit UV- inaktivierten MV. B95a Zellen wurden mit inaktivem MV in einer MOI von 2 inkubiert. Zu den Zeitpunkten 0 (A), 30 (B) und 60 Minuten (C) wurden die Zellen mit mAK 5C6 gefärbt, und die MFI im Durchflusszytometer bestimmt. Das Diagramm in (D) zeigt die MFI der drei Zeitpunkte.

4.8.8 Transfektion hSLAM-EGFP

Um eine genauere Beobachtung von SLAM zu ermöglichen, wurde ein SLAM-EGFP- Fusionsprotein verwendet und mit dem Konstrukt hSLAM-EGFP-N3 (Abschnitt 2.4) eine stabil transfizierte CHO Zelllinie hergestellt. Durch Verwendung des Plasmids pEGFP-N3 (Clontech) wird ein hSLAM Protein exprimiert, das am N-terminalen Ende mit fluoreszierendem EGFP fusioniert ist.

Zur Herstellung der stabilen Zelllinie wurden 6 µg des Plasmids mit 1 µl ApaI (10 U) Restriktionsendonuklease über Nacht bei 37°C linearisiert. ApaI schneidet das Plasmid einmal im pUC origin der im eukaryontischen System nicht verwendet wird.

Die Transfektion erfolgte mit Lipofektamin 2000. Auf einer 10 cm Kulturplatte wurden 30 µg DNA in 150 µl Optimem verdünnt. 90 µl Lipofektamin 2000 wurden ebenfalls in 1,5 ml Optimem verdünnt. Die Verdünnungen wurden vereinigt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert.

Zur Transfektion der Zellen wird die Lösung aus serumfreien Medium, DNA und Transfektionsreagenz auf 7 ml Nährmedium in den Kulturschälchen getropft und durch Schwenken vermischt.

Bis zur Analyse werden die Zellen bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Nach 24 h wurden die Transfektanten

mit ATV gelöst und in Selektionsmedium mit G418 überführt. **Abb. 5-32** zeigt die Anreicherung

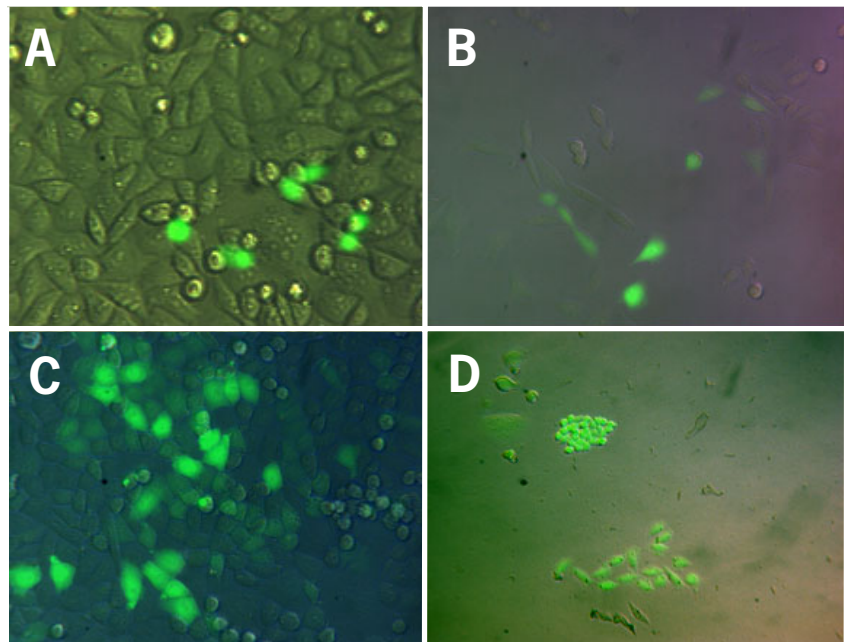


Abb. 4-32 Stabile Transfektion von hSLAM-EGFP. Das Plasmid hSLAM-pEGFP-N3 wurde linearisiert mit ApaI und in CHO Zellen transfiziert **(A)**. positive Zellen wurden im Zellsorter selektiert **(B)** und amplifiziert **(C)**. Nach 3 Selektionsdurchgängen wurden einzelne Klone subkloniert **(D)**. (Fluoreszenzmikroskop, Vergrößerung A-C 40x, D 20x)

hSLAM exprimierender Zellen. 48 Stunden nach der Transfektion sind nur wenige Zellen positiv **(A)**. Es zeigt sich aber bereits hier die erfolgreiche Transfektion. Über Zellsortierung wurden die positiven Zellen selektiert **(B)** und angereichert **(C)**. Nach dreimaligem sortieren im FACS-Sorter wurden die Zellen subkloniert **(D)** und einzelne Kolonien kultiviert.

Zur Infektion der CHO-SLAM-EGFP Zellen wurden die $5 \cdot 10^4$ Zellen auf Chamber slides ausgesät und mit MV WTFb in einer MOI von 0,05 inkubiert. Die Analyse erfolgte im Fluoreszenzmikroskop.

Nach 48 Stunden zeigte sich eine deutliche Infektion der Zellen mit Synzytienbildung (**Abb. 4-33**). Es zeigt sich eine Anreicherung von SLAM in der Nähe der Zellkerne der fusionierten Zellen und eine Downregulation von SLAM in der Peripherie.

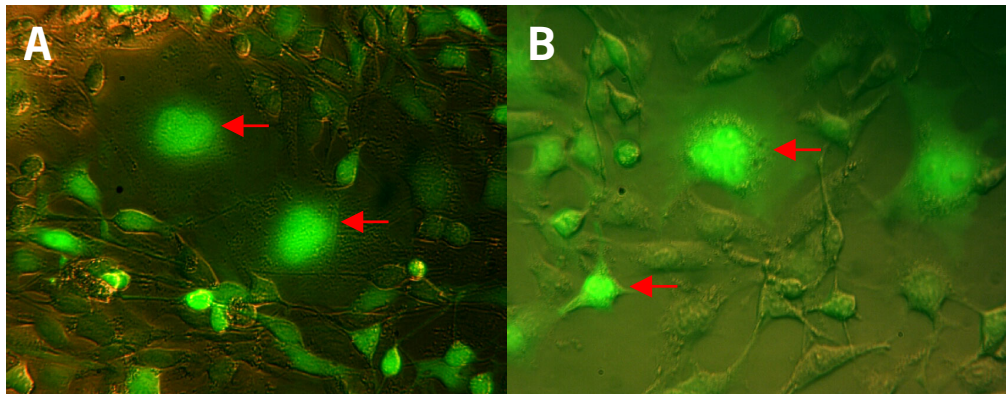


Abb. 4-33 Infektion CHO-SLAM-EGFP Zellen mit WTFb. $5 \cdot 10^4$ Zellen wurden auf Chamber-slides mit MV WTFb (MOI 0,05) inkubiert. Aufnahme im Fluoreszenzmikroskop zwei unabhängiger Infektionen (**A,B**). Zur Besseren Verdeutlichung sind zusätzlich die Zellen bei Hellfeld Belichtung überlagert. Erkennbar ist die starke Synzytienformation mit Anreicherung von SLAM um die Zellkerne (roter Pfeil). (Vergrößerung 40x)

4.8.9 Capping von SLAM nach Kontakt mit 5C6 Antikörper

$2 \cdot 10^5$ CHO SLAM Zellen wurden in einer 6-well-Platte kultiviert. Zur Markierung von SLAM wurden die Zellen für 30 Minuten mit mAK 5C6 sowie Alexa 488 bei 4°C inkubiert. Nach der Färbung wurde im Fluoreszenzmikroskop die Verteilung von SLAM beobachtet. Dazu wurde die Kulturplatte bei Raumtemperatur gelagert und in regelmäßigen Abständen mit Fluoreszenzlicht belichtet. In der ersten Minute nach der Färbung (**Abb. 4-34 A**) zeigt sich eine gleichmäßige Verteilung von SLAM über die Zelloberfläche. Nach 20 Minuten (**B**) oder 30 (**C**) Minuten ist bereits eine leichte Agglutination von SLAM erkennbar. Dies wird besonders deutlich an der rot umrandeten Zelle. Nach einer Stunde (**D**) liegt SLAM als Cap an einer Stelle der Zelloberfläche gesammelt vor. Nach längerer Inkubationszeit von 1 Std. 40 min wird dieses Cap deutlich kleiner (E), bis es nach 3 Stunden kaum noch erkennbar ist (F). Neben dem Capping kommt es also möglicherweise auch zu einer Reduktion von SLAM an der Zelloberfläche.

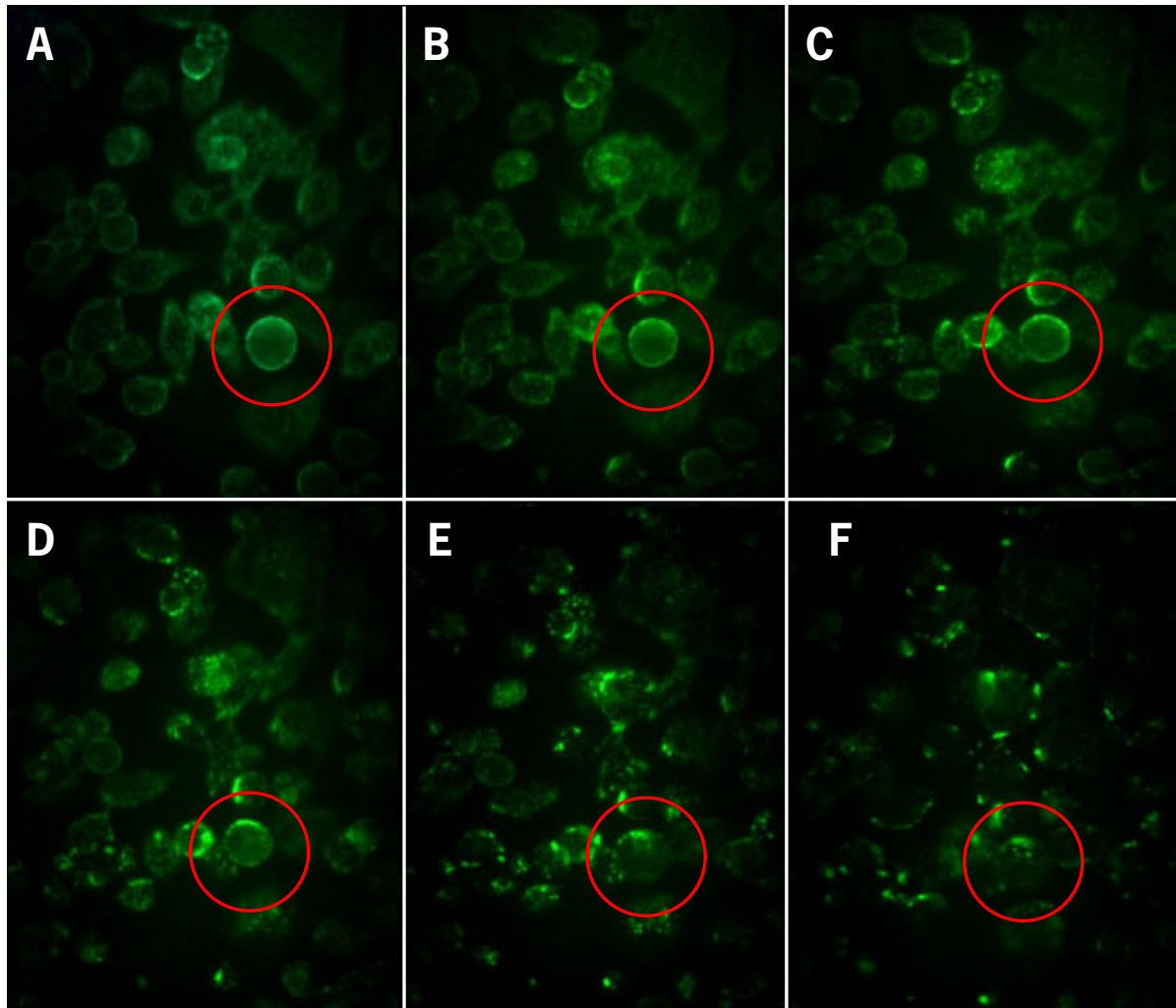


Abb. 4-34 SLAM-Capping nach Antikörper Kontakt. $2 \cdot 10^5$ CHO SLAM Zellen wurden in einer 6-well-Platte kultiviert. SLAM wurde die Zellen für mit mAK 5C6 sowie Alexa 488 bei 4°C markiert. Dargestellt ist die Verteilung von SLAM zu verschiedenen Zeitpunkten während der Inkubation bei Raumtemperatur. (A) 1 min, (B) 20 min, (C) 30 min, (D) 60 min, (E) 100 min, und (F) 3 Stunden. Aufgenommen im Fluoreszenzmikroskop. (Vergrößerung 100x)

4.8.10 SLAM Modulation und Agglutination nach MV Infektion

$2 \cdot 10^4$ CHO-SLAM Zellen wurden in Chamber-slides kultiviert und mit WTFb (MOI=0,5) infiziert. Zu verschiedenen Zeitpunkten nach Infektion wurden die Zellen mit PFA 4% fixiert und mit Triton X 100 Puffer permeabilisiert. Zur Markierung von SLAM wurden die Zellen mit Alexa 488 gekoppeltem mAK 5C6 inkubiert (grüne Fluoreszenz). Das MV H-Protein wurde mit L77 und Alexa 549 (rote Fluoreszenz) angefärbt. In **C** und **D** wurden zusätzlich die Zellkerne mit Dapi (100 nM) angefärbt (blaue Fluoreszenz). Außerdem wurde eine Hellfeldaufnahme untergelegt, um nicht fluoreszierende Zellen wiederzugeben. Die Fluoreszenzen wurden einzeln aufgenommen und nachträglich übereinander gelagert. Direkt nach Infektion **(A)** zeigt sich eine leichte Grünfärbung der Zellen, die gleichmäßig verteilt ist. Dies gibt die normale SLAM Verteilung auf der Zelloberfläche wieder. MV-H Protein gibt einen leichten punktuellen Hintergrund. Eine Stunde nach Infektion **(B)** ist SLAM punktuell stärker erkennbar und nicht mehr gleichmäßig verteilt wie in **(A)**. Vier Stunden nach Infektion **(C)** sind deutlich Synzytien erkennbar, die aus drei bis acht Kernen bestehen. Die Verteilung von Slam ist außerhalb der Synzytien zum größten Teil noch gleichmäßig. Innerhalb der Synzytien zeigen sich dagegen kleine Agglutinationen von SLAM (rote Pfeile). Nach 23 Stunden Inkubation bei 37 °C hat sich dieser Effekt verstärkt **(D)**. SLAM ist fast ausschließlich in der Nähe der Zellkerne zu finden und in der Peripherie herunterreguliert. Dies geht einher mit der Replikation des MV, also einer Erhöhung der MV-H Konzentration.

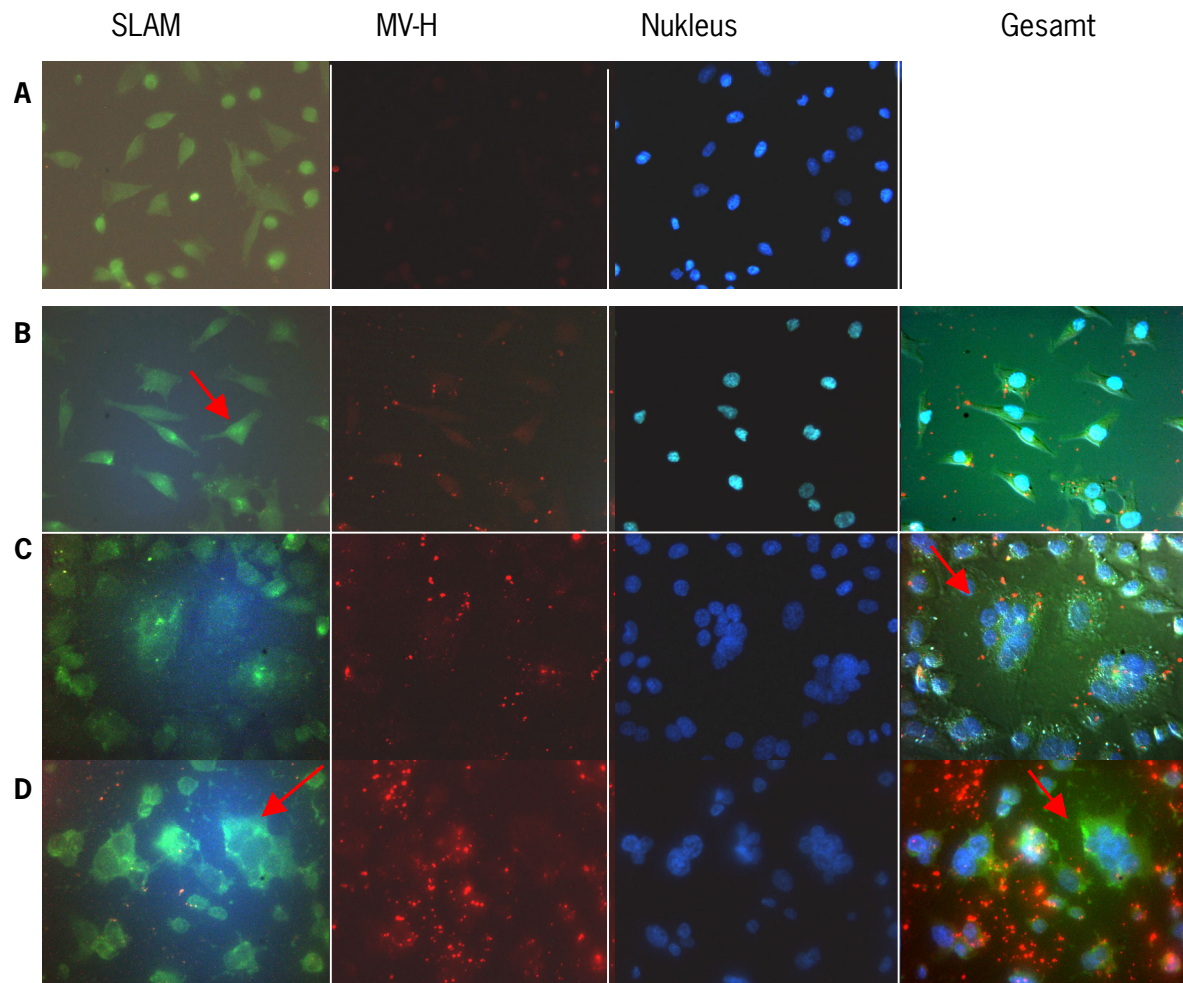


Abb. 4-35 SLAM Agglutination nach MV Infektion. $2 \cdot 10^4$ CHO-SLAM Zellen wurden in Chamber slides kultiviert und mit WTFb (MOI=0,5) infiziert. 0 (**A**), 1 (**B**) und 4 (**C**) und 23 Stunden (**D**) nach Infektion wurden die Zellen mit PFA 4 % fixiert und mit Triton X 100 Puffer permeabilisiert. Zur Markierung von SLAM wurden die Zellen mit Alexa 488 gekoppeltem mAK 5C6 inkubiert (grüne Fluoreszenz). Das MV H-Protein wurde mit L77 und Alexa 549 (rote Fluoreszenz) angefärbt. In **B** und **C** und **D** wurden zusätzlich die Zellkerne mit Dapi (100 nM) angefärbt (blaue Fluoreszenz). Außerdem wurde eine Hellfeldaufnahme untergelegt. Die Fluoreszenzen wurden einzeln aufgenommen und nachträglich übereinander gelagert. (Vergrößerung 40x)

4.8.11 SLAM bildet Adhäsionsplaques zwischen Nachbarzellen

CD150 ist ein kostimulatorisches Molekül. Um diese kostimulatorische Wirkung auszuüben, ist der Kontakt von SLAM exprimierenden Zellen oder löslichem sSLAM mit SLAM Molekülen auf der Zielzelle notwendig. Auf CHO-SLAM Zellen konnte vereinzelt eine Anreicherung von SLAM zwischen benachbarten Zellen nachgewiesen werden (**Abb. 4-36B**). Für die konfokale Mikroskopie von CHO-SLAM Zellen wurden $5 \cdot 10^4$ Zellen auf Chamber Slides ausgesät und bei 37°C in MEM 10 % FKS inkubiert. Nach 48 Std. wurden die Zellen mit PBS gewaschen (s. Färbung von Chamber slides) und mit PFA fixiert. Die Markierung erfolgte mit mAK 5C6 anti-SLAM sowie FITC Zweitantikörper.

Die gleiche Beobachtung konnte nach Transfektion mit hSLAM-EGFP von CHO Zellen gemacht werden (**Abb. 4-36 A**). Für die Transfektion in Chamber slides wurden $2 \cdot 10^4$ Zellen in 400 μl Nährmedium (MEM, 10 % FKS) pro well ausgesät. Es wird damit nach 18-24 h eine Konfluenz von 80-90% erreicht.

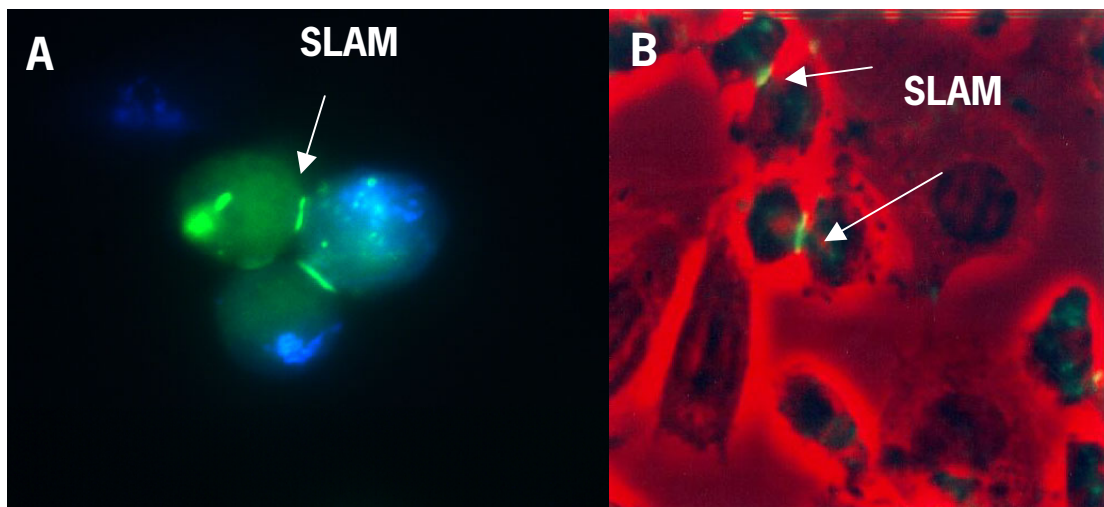


Abb. 4-36 SLAM Adhäsionsplaques zwischen Nachbarzellen. CHO Zellen wurden mit hSLAM EGFP sowie Golgi-Marker ECFP transfiziert und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. CHO-SLAM Zellen zeigen Aggregation von CD150 (**grün, Pfeile**) zwischen benachbarten Zellen. In (**A**) ist zusätzlich der Golgi-Apparat markiert (**blau**). Die Rotfärbung in (**B**) ist ein Ergebnis der Überlagerung von Fluoreszenzbild und Lichtmikroskopaufnahme.

Dazu wurden in einem sterilen Polypropylen Röhrchen in serumfreiem Optimem 3 µl Lipofektamine 2000-Transfektionsreagenz (Invitrogen) verdünnt, um ein Endvolumen von 50 µl zu erreichen. In einem zweiten Röhrchen wurden jeweils 1 µg DNA hSLAM-EGFP sowie ein Golgi-Marker Plasmid mit ECFP in 50 µl Optimem verdünnt.

Die Verdünnungen wurden vereinigt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Zur Transfektion der Zellen wird die Lösung aus serumfreiem Medium, DNA und Transfektionsreagenz auf die 400 µl Nährmedium in den Chamber Slides getropft und durch Schwenken vermischt.

Bis zur Analyse wurden die Zellen für 24 Std. bei 37 °C, 5 % CO₂ inkubiert. Auch hier zeigte sich deutlich die Aggregation von SLAM zwischen benachbarten Zellen.

Diese Aggregation trat nicht zwischen allen kontaktierenden Zellen auf und konnte auch nicht auf sich teilenden Zellen beobachtet werden. Es muss sich hier also um eine Anreicherung von SLAM handeln, die nur bei Kontakt zwischen zwei SLAM exprimierenden Zellen auftritt. Dies zeigt die laterale Mobilität von CD150 in der Plasmamembran, die möglicherweise zu einer homophilen Interaktion und nachfolgenden stimulatorischen Signalen innerhalb der Zellen führt.

4.8.12 Proteinauftrennung im Dichtegradienten

In den vorangegangenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass SLAM von der Zelloberfläche herunterreguliert wird und sich in bestimmten Bereichen innerhalb der Zelle sammelt. Über Dichtegradientenzentrifugation ist es möglich, die Expression und Position eines Proteins innerhalb der Zelle mit derjenigen bekannter Proteine zu vergleichen. Dies könnte auf mögliche Koexpression von Proteinen oder gleiche Transportwege hindeuten. CHO-SLAM und B95a Zellen wurden in einem 100 mm Kulturgefäß kultiviert und mit MV infiziert. Getestet wurden CHO-SLAM Zellen nach 6 und 8 Stunden Infektion mit einer MOI von 3, sowie B95a Zellen 4 Stunden nach Infektion sowie persistent mit WTFb infizierte B95a Zellen. Die hohe MOI und kurze Inkubationszeit wurde gewählt um eine Synzytienbildung zu vermeiden und die Proteinexpression in Einzelzellen zu verfolgen.

Nach Waschen mit PBS wurden die Zellen mit 2 ml Natriumkarbonat (500 mM) pH 11 abgeschabt und homogenisiert. Die 2 ml der Zellsuspension wurden mit 85 % Sukrose (in MBS: 25mM MES pH6,5 + 150 mM NaCl) vermischt. Das Zell-Sukrose Gemisch wurde auf den Boden eines Ultrazentrifugenröhrchens gelegt (SW40). Zur Ausbildung des Gradienten wurden 5 ml 30 %ige Sukrose und darauf 3 ml 5 %ige Sukrose (in MBS+250mM Natriumkarbonat) gelegt. Zentrifugiert wurde für 18 h bei 35.000 rpm (Rotor: SW40ti).

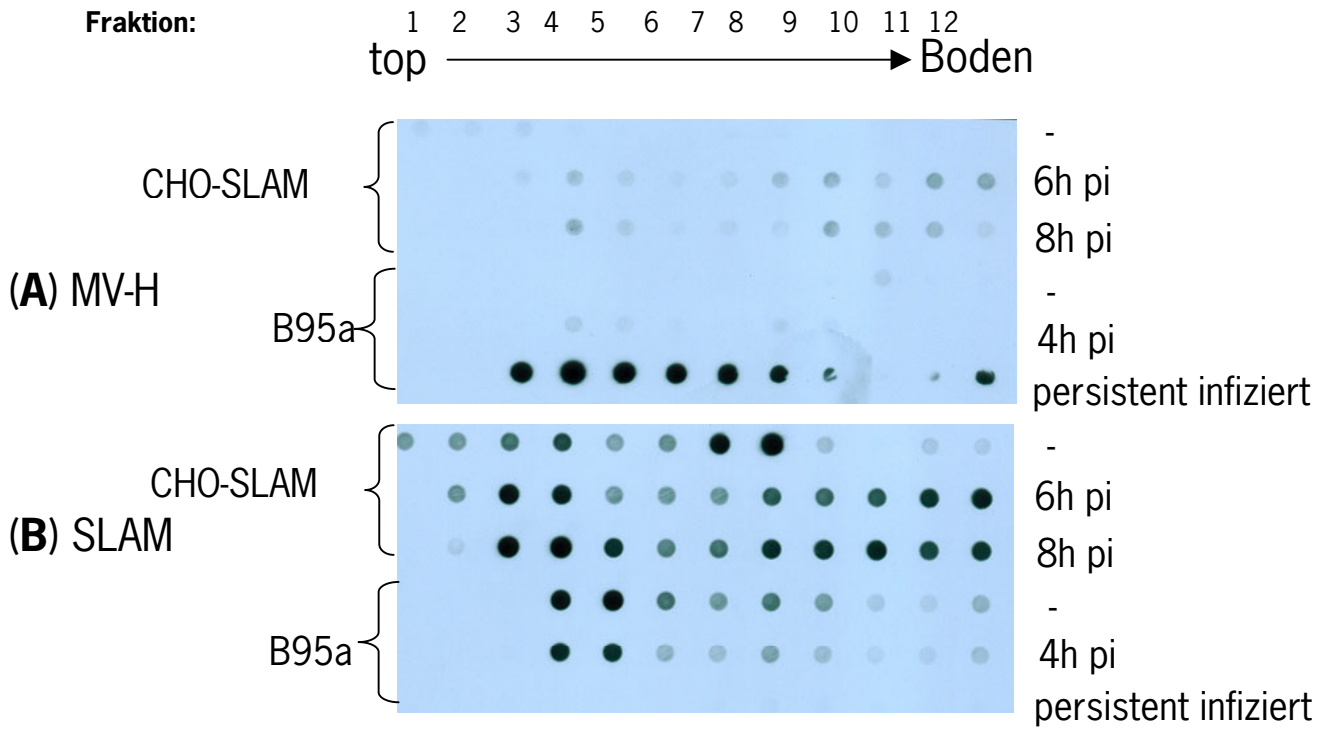
Nach der Zentrifugation wurden von den 12 ml der Gradientenzentrifugation jeweils 1 ml Fraktionen durch Pipettieren abgenommen und jeweils 20 µl im Dot-Blot analysiert (**Abb. 4-37**).

MV-H wurde als Infektionskontrolle angefärbt (A). In uninfizierten Zellen ist keine MV-H Expression zu finden. Auch zeigt sich keine Hintergrundfärbung, was für die Empfindlichkeit der Methode spricht. In CHO-SLAM Zellen ist nach 6 und 8 Stunden eine leichte H-Expression zu finden. Eine schwache H-Expression ist in B95a zeigen Zellen die 4 Stunden infiziert wurden. Dagegen zeigt sich eine hohe Expression von MV-H in persistent infizierten B95a Zellen.

Expression von SLAM wurde in uninfizierten Zellen in Fraktion 1-5 gefunden. Nach Infektion der Zellen zeigt sich eine größere Verteilung von SLAM über den gesamten Gradienten und eine erhöhte Verteilung in Fraktion 8-12. Dies könnte auf eine Kolokalisation mit MV-H Proteinen hinweisen, welche ebenfalls bei CHO-SLAM Zellen in diesen Fraktionen vorherrschend sind.

Zur Überprüfung von Colokalisationen wurden zusätzliche Kompartiment Marker getestet. Caveolin ist in Clathrin-freien Membran-Einschlüssen der inneren Plasmamembran zu finden. Caveolin ist außerdem zu finden im Trans Golgi Network (TGN) und Transportvesikeln. In CHO-SLAM Zellen zeigt Caveolin eine ähnliche Verteilungsänderung wie SLAM. In Fraktion 3-10 vor der Infektion und in 9-12 nach

der Infektion. α -Tubulin und andere Marker zeigten dagegen keine Ähnlichkeit in der Verteilung im Gradienten.



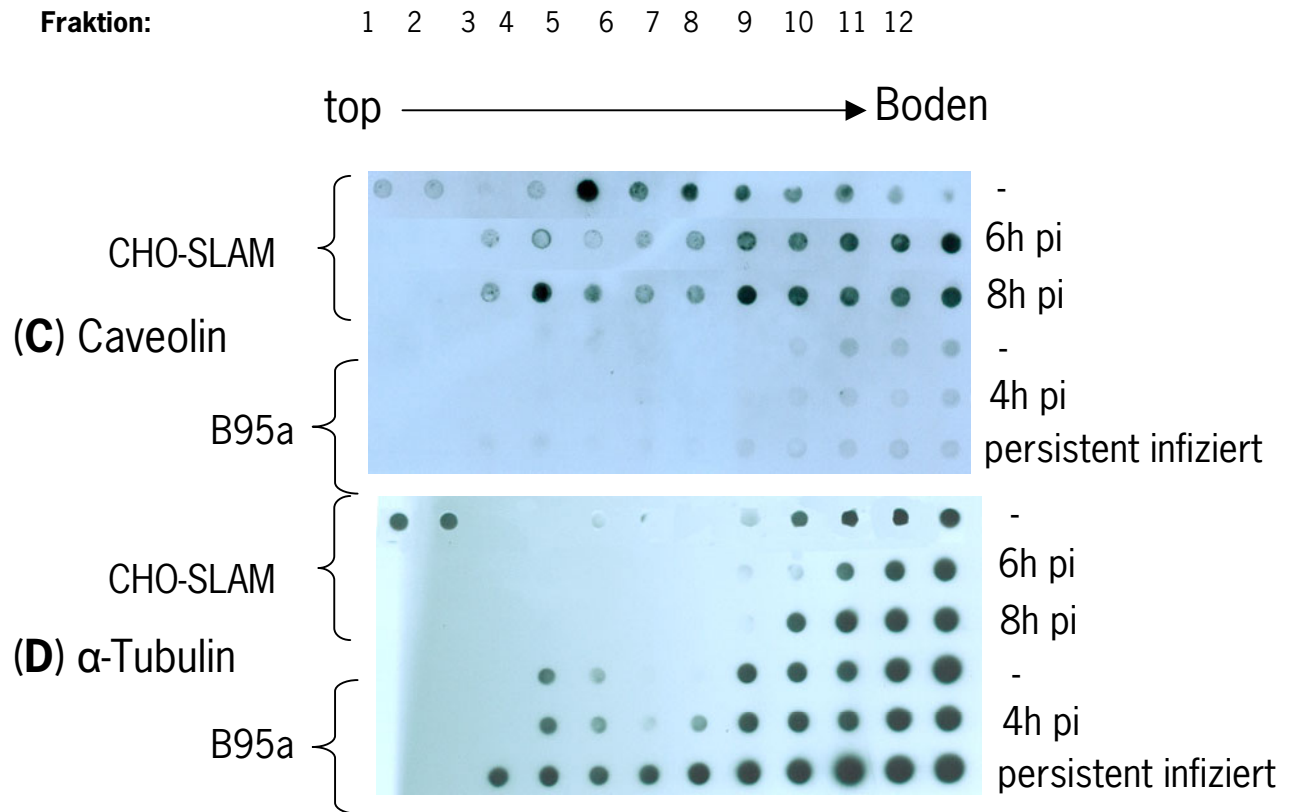


Abb. 4-37 Dichtegradientenzentrifugation. CHO-SLAM und B95a Zellen wurden in einem 100 mm Kulturgefäß kultiviert und mit MV infiziert. Getestet wurden CHO-SLAM Zellen nach 6 und 8 Stunden Infektion, sowie B95a Zellen 4 Stunden nach Infektion sowie persistent mit WTFb infizierte B95a Zellen. Nach Lyse der Zellen und Auftrennung im Sukrosegradienten wurden im Dot-Blot je 20 µl Lysat mit spezifischen Antikörpern gegen MV-H (A), SLAM (B), Caveolin (C), oder α-Tubulin (D) gefärbt.

5 Diskussion

Mit CD46 konnte 1993 der zelluläre Rezeptor für die MV Vakzinestämme Edmonston (Edm) und Halle identifiziert werden (Naniche et al., 1993; Dörig *et al.*, 1993). CD46 hat jedoch nur eine geringe oder keine Affinität zu vielen Wildtyp Isolaten. Die meisten MV-Wildstämme verwenden kein CD46 als Rezeptor und induzieren auch keine CD46-Downregulation von der Zelloberfläche (Schneider-Schaulies *et al.*, 1995; Bartz *et al.* 1997; Hsu *et al.* 1997; Buckland und Wild 1997). In CD46-positiven Human- und Affen- Zell-Linien fehlt zudem die durch die Vakzinestämme herbeigeführte Synzytienbildung (Tanaka *et al.*, 1998). Für einige in Würzburg isolierte Masernvirus Wildtypen konnte gezeigt werden, dass sie weder CD46 binden, noch herabregulieren. Der in dieser Arbeit vorrangig verwendete MV Wildtyp Stamm WTFb zeigt keine Infektionsinhibition nach einer Vorbehandlung mit anti-CD46 AK (Firsching, 1999). Dies legt die Vermutung nahe, dass MV Wildtypen einen anderen zellulären Rezeptor verwenden. Ziel dieser Arbeit war es daher, ein als zellulären Rezeptor für MV Wildtyp dienendes Oberflächenprotein zu identifizieren.

5.1 Identifizierung von SLAM durch Screening einer humanen PBL cDNA Expressions-Genbank und mAK 5C6

Der monoklonale IgG1 Antikörper 5C6 (**Abb. 4-1**) blockiert die Virusbindung von WTFb an B95a Zellen dosisabhängig bis zu 90 %, bei einer Antikörperkonzentration von 50 µg/ml. Bereits eine Antikörperkonzentration von nur 10 µg/ml bewirkt eine Inhibition um 60 %. Der Antikörper 5C6 hemmt dabei die spezifische Bindung sowohl des Wildtystammes WTFb als auch des Impfstammes Edm (**Abb. 4-2**). Da B95a Zellen kein CD46 exprimieren, das als Bindungs- oder Eintrittsrezeptor dienen kann, muss der Antikörper einen anderen, unbekanntem Rezeptor binden. Die starke Inhibition der Bindung deutet zudem darauf hin, dass das von mAK 5C6 erkannte Protein der einzige MV Rezeptor auf B95a Zellen ist. mAK 5C6 geht zudem eine starke Bindung mit PBL ein (**Abb. 4-13**).

Zur Identifizierung des Proteins wurde eine retrovirale humane PBL cDNA Expressionsgenbank (**2.5**) mit Hilfe des Antikörpers 5C6 gescreent. Die cDNA wurde von der Firma Stratagene aus der mRNA von Milzgewebeproben hergestellt. Die Milzen stammen aus fünf Gewebeproben von weiblichen und männlichen Spendern im Alter von 44-70 Jahren. Als Zielzellen wurden CHO-K1 Zellen verwendet, die nicht von MV infiziert werden und nur eine schwache Bindung mit MV eingehen. Da es sich um eine

Hamster Zell-Linie handelt, fehlen humane Oberflächenproteine. Die Zellen bieten sich daher zur Expression humaner Proteine an. Auch der retrovirale cDNA Vektor replizierte stark in CHO-K1 Zellen. Bei Verwendung von Retroviren, die anstelle der PBL-cDNA ein Luciferase-Gen enthielten, lag die gemessene Lumineszenz von infizierten CHO-Zellen deutlich über derjenigen von NIH3T3 Zellen, die als gut infizierbare Kontrollzellen dienten (**Abb. 4-4**). CHO Zellen sind also hervorragend für die Infektion mit der retroviralen Genbank geeignet.

Die CHO Zellen wurden mit der retroviralen cDNA Expressionsgenbank infiziert. Über Integration der cDNA in das Zellgenom, vermittelt durch die retrovirale Integrase, konnten die infizierten Zellen über Magnetsäulen oder FACS-Sortierung selektiert und anschließend amplifiziert werden. Bei Verwendung von Magnetsäulen wurden die Retrovirus infizierten CHO-K1 Zellen mit mAK 5C6 sowie magnetischen anti-IgG Zweitantikörpern inkubiert. Während der Messung lässt sich die Anzahl der sortierten Zellen nicht bestimmen, wie es bei FACS-Sortierung der Fall ist. Die Verwendung von MicroBeads lässt jedoch eine Sortierung ohne Zellverluste zu. Bei FACS-Sortierung wurden die Zellen mit mAK 5C6 sowie einem FITC gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Positive Zellen werden gezielt selektiert, es gehen jedoch 40 % der Zellen aufgrund der Meßmethode verloren. Die Kombination von Sortierung der Zellen über Magnetsäule und FACS erwies sich als ausgezeichnete Ergänzung. Nach der ersten FACS-Sortierung wurden aus $2 \cdot 10^6$ transduzierten Zellen nur $1 \cdot 10^4$ Zellen positiv aussortiert (**Abb.4-5**), wobei mit einem Hintergrund von ca. $1 \cdot 10^3$ Zellen zu rechnen ist (**5.2.7**). Die aussortierten Zellen wurden vermehrt. Bei der zweiten FACS-Sortierung wurden aus $7 \cdot 10^6$ Zellen $5 \cdot 10^4$ positive Zellen selektiert. Im FACS-Diagramm zeigte sich eine deutliche Vermehrung positiver Zellen. Nach einer weiteren Proliferation konnten aus $2,37 \cdot 10^6$ Zellen, $2 \cdot 10^5$ Zellen aussortiert werden, die nach Markierung mit mAK 5C6 deutlich positiv waren (**Abb.4-5**). Nach Subklonierung der Zellen wurde Klon E aussortiert, der im FACS eine starke mAK 5C6 Bindung aufwies (**Abb.4-6**). Nach einer weiteren Subklonierung von Klon E der mAK 5C6 positiven CHO-K1 Zellen, konnte eine stabile Zell-Linie entwickelt werden, die an der Zelloberfläche das gewünschte Protein exprimierte.

Das in diesen Zellen exprimierte Protein konnte als **SLAM (Signaling Lymphocytic Activation Molecule oder CD150)** identifiziert werden. Die in dieser Arbeit beschriebenen CHO-SLAM Zellen bezeichnen daher die mAK 5C6 positiv selektierten CHO Zellen Klon E.

Zur Identifizierung der in das CHO-Genom integrierten cDNA wurde die genomische DNA isoliert (**Abb.4-8**). Über spezifische Primer (3' pFB, 5' Retro), die an den bekannten Enden der integrierten Vektor-DNA ansetzen konnte die unbekannte cDNA amplifiziert werden (**Abb.4-8**). Zur Sequenzierung

der DNA wurden Primer verwendet (pFB1 und pFB2), die wenige Basenpaare vor den mitgelieferten Primern, innerhalb der integrierten cDNA, binden. Dabei konnten zwei zu SLAM gehörige Banden mit einer Größe von 1,4 und 1,7 kB identifiziert werden. Die 1,7 kB lange cDNA kodiert den gesamten funktionellen Teil der SLAM-cDNA, wie von Cocks *et al.* beschrieben (**Abb. 4-10**). Die 1,4 kB Bande entsteht durch alternatives Splicen.

Zum Beweis, dass der Antikörper 5C6 SLAM erkennt, wurden die CHO-SLAM Zellen neben mAK 5C6 auch mit den kommerziell erhältlichen anti-SLAM Antikörpern CDw150 und IPO3 markiert. Im Durchflusszytometer zeigten die Zellen eine deutliche SLAM-Expression mit den anti-SLAM Antikörpern, nicht jedoch mit Antikörpern, die gegen CD48 oder CD58 gerichtet waren (**Abb. 5-11**). Die Expression von SLAM an der Zelloberfläche konnte mit dem mAK 5C6 neben CHO-SLAM Zellen auch auf B95a (**Abb. 4-12**) und PBL (**Abb. 4-13**) nachgewiesen werden.

SLAM ist ein Typ I Transmembranprotein mit einer 27 Aminosäure langen hydrophoben Leader Sequenz, einer 202 AS langen extrazellulären Region, die 8 potentielle N-Glykosylierungsstellen beinhaltet, sowie einer 77 AS großen zytoplasmatischen Domäne. Drei der vier potentiellen Tyr- Phosphorylierungsstellen der zytoplasmatischen Domänen sind spezifische SH2 Bindungsstellen. SLAM wird in die Gruppe der Immunglobulin (Ig) Superfamilie eingereiht, die zwei typische extrazelluläre Domänen aufweist, eine Konstante (C2), sowie eine den variablen Domänen der Ig Moleküle ähnliche V-Domäne. Ono *et al.*, 2001 konnten zeigen, dass MV an die V-Domäne von SLAM binden.

Das humane CD150 konnte auf Chromosom 1q22 lokalisiert werden. Das Gen ist in 7 Exons aufgeteilt, die in der Region AL1219815.13 liegen (**Abb.5-4**). Die Exons werden entsprechend den Regionen im Protein als L-, sowie V-, C-, TM-, CP1-, CP2-, und CP3- Region bezeichnet.

Als Mitglieder der CD-2 Gruppe der Ig Superfamilie wurden neben SLAM die Proteine CD2, CD84, CD48, CD58, 2B4 und Ly-9, sowie die Proteine SF2000 und SF2001 der CD2-Gruppe (Fraser *et al.*, 2002) identifiziert.

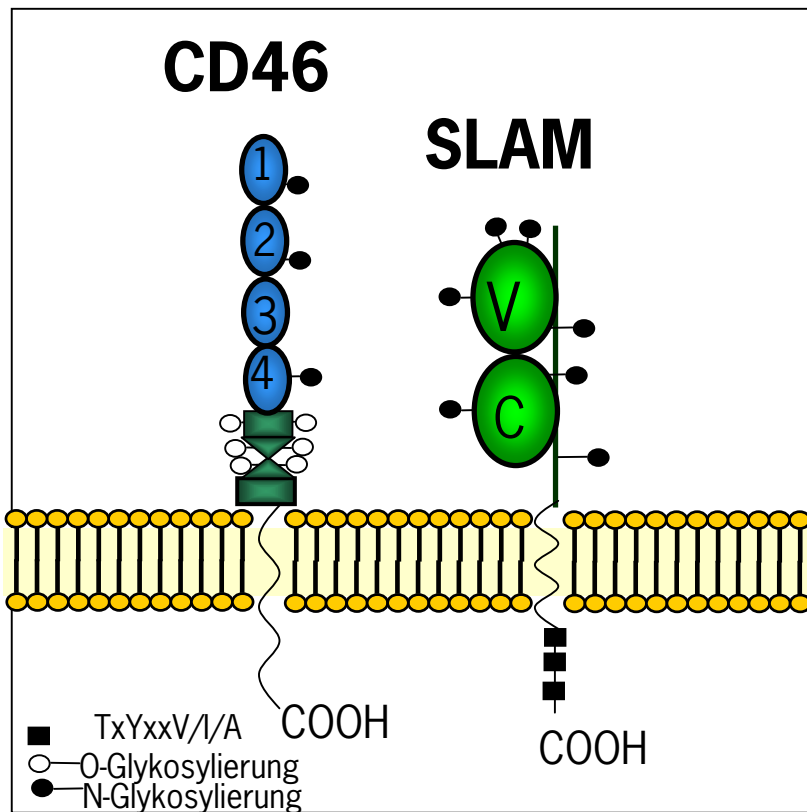


Abb. 5-1 Modell der Proteine SLAM (CD150) im Vergleich zu CD46.

mSLAM	*****	*****	*****	*****A	GCT*GTCCTGCCGA	GC****TGAGCTGA	24	
hSLAM	GGTTCAGGAACCTCG	TGGTTCTGATACATA	AATCAGACAGCCTCT	GCTGCATGACACGA-	---TGC-T---TG	GCATCTG-----A-C	90	
mSLAM	*GCTGAGCTCACAGC	TGGGGACCTGTCTG	CGATTGCT*GGCTAA	↑	TGGATCCCAAAGGAT	CCCTTTCCTGGAGAA	TACTTCTGTTTCTCT	112
hSLAM	T--CAG---*G--	CA--AT---TC--T	-TCC-CA-T---G	↑	-----G--GC	T---C---T---OCT	TCG-G-----	179
mSLAM	CCCTGGCTTTTGTAGT	TGAGCTACGGAAACAG	GTGGAGGTGTGATGG	↑	ATTGCCAGTGATTC	TCCAGAAGCTGGGAC	AGGACACGTG**GCT	200
hSLAM	-----G-G	CA-----	-----GC-CA-----A	↑	-C-----AA	---G-C-T---*	--C-A*---CT---	267
mSLAM	GCCCTGACGAATGA	ACATCAGATAAATAA	GAGCGTGAACAAAAG	↑	TGTCGGATCCTCGT	CACCATGGCGACGTC	CCCAGGAAGCAAATC	290
hSLAM	-----AT	-AG***-----	-----A-----	↑	CA--A--TG---	---A---A-AA--	A-TG-AG-A--GTGT	354
mSLAM	CAACAAGAAATGT	GTCTTTTGTATCTCTC	TAAAGGGAGCTATCC	↑	AGATCACCTGGAGGA	TGGCTACCATTTC	ATCAAAAAACCTGAG	380
hSLAM	-G-G--C---A-	-----C---CA-	CG---CAG--CC---	↑	-CG-T-T--A-GA--	-C-----A-G---T-	TCTGG-G---T--C-C	444
mSLAM	CCTGAAGATCCTCGG	GAACAGGCGGGAGAG	TGAAGGATGGTACTT	↑	GGTGAGCGTGGAGGA	GAACGTTTCTGTTC	GCAATTCTGCAAGCA	470
hSLAM	---GG--A-GG-A	A-G---AA---GA	---G---G---C-	↑	TA--C-C---A-	A--T---A-----	--GC-T---CT---	534
mSLAM	GCTGAAGCTTTATGA	ACAGGCTCCTCCCTCC	AGAGATTAAGTGTCT	↑	AAACAAAACCCAGGA	GAACGAGAATGGGAC	CTGCAGCTTGCTGTT	560
hSLAM	-T--G-----	G-----A-----	-----A-----TT-	↑	-----G-----	-----*****	-----C---A-AC-	618
mSLAM	GGCCTGCACAGTGAA	GAAAGGGGACCATGT	GACTTACAGCTGGAG	↑	TGATGAGGCAGGCAC	CCACCTGCTGAGCCG	AGCCAACCGCTCCCA	650
hSLAM	-G-----G-	-G-----	-G-----	↑	---AA---G---	-----CA---A-C	-----A-----	708
mSLAM	CCTCCTGCACATCAC	TCTTAGCAACCAGCA	TCAAGACAGCATCTA	↑	CAACTGCACCGCAAG	CAACCCTGTCAGCAG	TATCTCTAGGACCTT	740
hSLAM	-----TC-C-	C--CG--CC-----	-GCT---AT-----	↑	--T-----TG--	-----A-----A	C-AT--CCA-----	798
mSLAM	CAACCTATCATCGCA	AGCATGCAAGCAGGA	ATCCTCCTCAGAATC	↑	GAGTCCATGGATGCA	ATATACTCTTG**TA	CCACTGGGGTCTGTT	828
hSLAM	--G-***-G-G-C	C-G---G-ACA--	***-CA-CTCAG-A	↑	A-AA-----**	G-G--TG-G-GC-G	TT-GG---T---A-C	880
mSLAM	ATAATCTTTCATCCTG	GTTTTACGGCAATA	ATAATGATGAAAAGA	↑	CAAGGTAATCAAAT	CACTGCCAGCCACCA	GTGGAAGAAAAAAGC	918
hSLAM	-G--TC---A-	GT*****-T---	C-CA-T--G---	↑	AG-----ACG--C	-T-A---A-A--	-----A-----	964
mSLAM	CTTACTATTATGCCC	CAAGTACAGAAATCA	GGGCCTCAAGAGAAG	↑	AAACTTCATGATGCC	CTAACAGATCAGGAC	CCCTGCACAACCATT	1008
hSLAM	---T---G-C-	-----C---C-	---T---TTC	↑	-----**--CT-	T-CC---C-----	--T---C---A	1051
mSLAM	TATGTGGTGCCACA	GAGCCTGCCCCAGAG	TCTGTCCAGGAACCA	↑	AACCCACCACAGTT	TATGCCAGTGTGACA	CTGCCAGAGAGTGA	1098
hSLAM	-----T-----	-----T-----	-----A-----	↑	---TT--T---C	-----T-----	--T-----	1141
mSLAM	C*CCATATACCCAGT	GAAAGGACTTTTGA	AGGAGGATAGAAGAA	↑	CCAAAATCCACTCTG	AACTGGACCCCGGT	CCCAAGTTCTCTGTG	1187
hSLAM	-A---G-G---A-CA	*--G-----C---	---AA-G--A-	↑	-----GA-----	---T-G--A-A--*	-----C--C--	1229
mSLAM	ACAGAAA*CTGCAC	ATCTGTAACCTTCTC	CAATCAGTTCCTTGG	↑	TGACGGATCTGC*AC	AGGCGTGCTTATGAA	GTAGATGAG*AAGTG	1273
hSLAM	G---C-TG-----	G-----C-----	AG---AC-----	↑	---T-TT--T-C--	-TA-A-C**G---	A-GA-CA--G----	1317
mSLAM	AGGCTTCTGGGCAT	GCAACCTGCTCTGCT	GCTGACACAGATATG	↑	AAGCAGAGA*TCCCG	TGGTA*CAGTGTACC	ATCTTTGC**TGTAG	1359
hSLAM	-----CAA-A--	TT-G-T---G---A	-TG-CTG---GCGCA	↑	G-A-----CG-TA-T	--A-A---C--T--	-----TGT-----	1407
mSLAM	CAGAT*****	**AATGTGGG****	**TTTAGGCATCTCA	↑	CTCTTTGCTGGACTG	GATAACAGAACTCAA	AAAAAAAAAAAAAAAA	1430
hSLAM	-----GAAATGGACA	GT-----A-TTCAG	AC---G-----TG	↑	-----G-----ACT	-----T-A--A--G	-CTG---GCC-GG-C	1497
mSLAM	A*****	*****	*****	↑	*****	*****	*****	1431
hSLAM	-TCTGAGTACCTATC	TCACACTGACCAC	CAGTCACAAAGTCTG	↑	GAAAAGTTTACATTT	TGGCTATCTTTACTT	TGTTCTGGGAGCTGA	1587
mSLAM	*****	*****	*****	↑	*****	*****	*****	1431
hSLAM	TCATGATAACCTGCA	GACCTGATCAAGCCT	CTGTGCCTCAGTTTC	↑	TCTCTCAGGATAAAG	AGTGAATAGAGGCCG	AAGGGTGAATTTCTT	1677
mSLAM	*****	*****	*****	↑	*****	*****	*****	1431
hSLAM	ATTATACATAAAACA	CTCTGATATTATTGT	ATAAAGGAAGCTAAG	↑	AATATTATTTTATTT	GCAAAACCCAGAAGC	TAAAAAGTCAATAAA	1767
mSLAM	*****	*****	*****	↑	*****	*****	*****	1431
hSLAM	CAGAAAGATGATTT	TGAGAAA	1789					

A

Abb. 5-2 SLAM DNA Sequenz von Mensch (hSLAM) und Maus (mSLAM). Gekennzeichnet sind die kodierenden Sequenzen der Leader Region (L), V- und C-Domänen (V, C), der Transmembran-Region (TM), sowie der zytoplasmatischen Domänen 1-3 (CR1, CP2, CP3).

Mouse	MDPKGSLSWRILLFLSLAFELSYGTGGGVMDCPVILQKLGQDTW
Human	-----L--LTFV-----GA-----RM-N--K--RQ--SKVL
Saguinus oedipus	-----LF-LTFV-----EP-----RM-N--K-VQQ--SDVL
Mouse	LPLTNEHQINKSVNKSVRILVTMATSPGSKSNKKIVSFDLSKGSYPDHLEDGYHFQSKNL
Human	----Y-*R-NKSMNKSIIH-V----K-LENSVEN----L-P-EAGP-RY-G-R-K-YLENL
Saguinus oedipus	----H-*R-NTSMNKSIIH-V----K-LENSVEN----L-P-EAGP-RY-K-R-R-YLENL
Mouse	SLKILGNRRESEGWYLVSVVEENVSVQQFCKQLKLYEQVSPPEIKVLNKTQENENGTCPLL
Human	T-G-RES-K-D-----MTL-KNVS--R-CL--R-----T-----NKT-**-NGTCT-I
Saguinus oedipus	S-A-RESTKKD----FMTL-KNIS--R-CLH-----T-----NKT-**-NGTCT-I
Mouse	LACTVKKGDHVTYSWSDEAGTHLLSRANRSHLLHITLSNQHQDSIYNCTASNVPVSSISRT
Human	-GC--E-----A---EK---P-NP-NSS---SL--GP--A-N--ICTV---I-NN-Q-
Saguinus oedipus	-GCI-K-----A---EK---P-SP-NSS---SL--GP--AKN--VCTV-----NS-QD
Mouse	FNLSSQACKQESSSESSPVMQYT
Human	-S*PWPFCRTD*P--TK--AV-A
Saguinus oedipus	-I*PWLRCRQ-*P--TNI-PV-A
Mouse	LVPLGVVIIIFILVFTAIIMM
Human	*GL-GG--MILIMVV*-LQL
Saguinus oedipus	WLS-AG--IILIVIA*-MLL
Mouse	KRQGSNHCQPPVEEKS LTIYAQV QKSGPQEKLLHDALTDQDPC TTIYVAA TEPAPESVQEPNF ETVYASV TLPEP
Human	R-R--T--Y-TT-----P--LQ---*-SFPA-----
Saguinus oedipus	R-R--TD-Y-TTT-K-N-----P--LQ---*-SFPA-----V--P--T-S-----

B

Abb. 5-3 SLAM Proteinsequenz. Maus, Mensch und Saguinus oedipus im Vergleich.

5.2 Zelluläre Verteilung und natürliche Funktion von SLAM

SLAM ist ein Zelloberflächen-Glykoprotein. Die gesamte cDNA hat eine Länge von 1.860 Basen, die einen offenen Leserahmen kodiert. Nach Behandlung nach. Wird das SLAM-Protein nach Immunpräzitation mit N-Glykanose behandelt, liegt die Größe bei 70 kDa, was mit der Größe der cDNA korreliert (Cocks *et al.*, 1995). Je nach Glykosylierung variiert die Größe zwischen 70 und 90 kDa. Insbesondere in B95a Zellen ist SLAM stark phosphoryliert, im Western Blot ist daher die SLAM Proteinbande als diffuse Bande zu erkennen. Die Phosphorylierung innerhalb der CHO-SLAM Zellen entspricht dagegen derjenigen in PBMC oder BJAB Zellen (**Abb.4-16**).

Humanes SLAM (CD150) wird auf ausgereiften Thymozyten, CD45Ro^{high} Gedächtniszellen und einigen B-Zellen exprimiert. SLAM konnte bisher nicht auf Monozyten, Granulozyten und Zellen nichtlymphatischer Organe nachgewiesen werden (Cocks *et al.*, 1995; Aversa *et al.*, 1997).

SLAM wird nach Aktivierung schnell induziert auf allen T- und B- Zellen (Sidorenko and Clark, 1993, Cocks *et al.*, 1995; Aversa *et al.*, 1997). SLAM wird unterschiedlich auf CD4⁺ T-Zellen exprimiert. Ein hoher SLAM Level wird auf TH₁- Zellen exprimiert, nur geringe Mengen auf TH₂- Zellen (Hamalainen *et al.*, 2000). Die Untersuchung der cDNA Expression konnte diese Verteilung bestätigen. In B95a Zellen wurde eine ähnlich hohe Expression von SLAM nachgewiesen wie in CHO-SLAM Zellen (**Abb. 4-**

17). Eine etwas geringere SLAM cDNA Expression wurde in den BJAB Zellen festgestellt. Keine Expression der SLAM cDNA zeigten CHO-K1, CHO-CD46, Jurkat oder Vero Zellen. U937 Zellen exprimierten ebenfalls kein SLAM, dagegen wurde eine leichte Expression von SLAM auf U937x nachgewiesen. U937x Zellen fehlt CD46. U937x wurden auf das Fehlen von CD46 gezüchtet, wodurch Zellen mit höherer SLAM Expression vermehrt wurden.

Obwohl Monozyten kein SLAM exprimieren, kann SLAM nach Stimulation mit LPS oder MV sehr schnell induziert werden (Minagawa *et al.*, 2001). Auch ausgereifte Dendritische Zellen (DC) exprimieren SLAM (Ogimoto *et al.*, 2001; Klagge *et al.*, 1999; Klagge *et al.*, 2000). Anti SLAM Antikörper hemmen die Infektion mit MV von aktivierten Monozyten und ausgereiften DC's (Minagawa *et al.*, 2001, Yanagi *et al.*, 2002). Die Infektion von Monozyten und Makrophagen und damit die Ausbreitung des Virus wird demnach durch SLAM vermittelt.

Stimulation von SLAM mit einem monoklonalen Antikörper führt zu IL-2 unabhängigen T-Zell Expansion und INF- γ Produktion von aktivierten T-Zellen (Cocks *et al.*, 1995, Aversa *et al.*, 1997). Ligation mit dem monoklonalen AK IPO-3 führt zu B-Zell Proliferation, die durch anti-CD40 und IL-4 induziert wird (Sidorenko and Clark, 1993). Aktivierte humane T-Zellen exprimieren zusätzlich zur membrangebundenen Form von SLAM (mSLAM) auch mRNA, die ein lösliches SLAM Protein (sSLAM) kodiert. Dieser lösliche SLAM Variante fehlen 30 AS, die die gesamte 22 AS-lange Transmembranregion umfasst (Cocks *et al.*, 1995). Zudem konnte eine zytoplasmatische Form (cSlam) beschrieben werden, der die Leadersequenz fehlt, sowie eine variable membrangebundene Form (vmSlam) mit einer verkürzten zytoplasmatischen Domäne (Cocks *et al.*, 1995).

Die lösliche sowie die membrangebundene Form von SLAM induzieren Proliferation und Immunglobulin Synthese von aktivierten humanen B-Zellen (Punnonen *et al.*, 1997). Auf der anderen Seite führt SLAM Signaling auch zu CD95 vermittelter Apoptose von B-Zellen (Mikhalap *et al.*, 1993). Kontakt mit mAK IPO-3 induziert eine schnelle Freisetzung von freiem Kalzium (Ca^{2+}). Dies führt zu Zellproliferation, die durch CD40 mAK und IL4 induziert werden kann (Sidorenko *et al.*, 1993).

Stimulation von CD150 mit mAK führt zu IL2 und CD28 unabhängiger, aber Cyclosporin A sensitiver Proliferation (Punnonen *et al.*, 1997). SLAM Stimulation induziert INF- γ Produktion durch CD4 T-Zellen und Ig-Produktion durch aktivierte B-Zellen (Cocks *et al.*, 1996; Punnonen *et al.*, 1997; Latour *et al.*, 2001). Stimulation mit IL2, IL4 oder IL10 hat keinen Effekt auf die SLAM-Expression. Durch SAC, anti μ mAk und anti CD40 mAK können hohe Mengen von SLAM von über 85 % im Vergleich zur Mediumkontrolle erreicht werden (Punnonen *et al.*, 1997).

Die Signalweiterleitung nach SLAM-Aktivierung ist eng verbunden mit SAP (SLAM associated protein oder DSHP). SAP wird vor allem in T-Zellen exprimiert, wobei eine etwas höhere Expression in CD8⁺, als in CD4⁺ Zellen zu finden ist. SAP neben T-Zellen auch in einigen B-Zellen identifiziert werden, sowie in Natürlichen Killerzellen (NK). Ein Defekt von SAP kann zu unkontrollierter B-Zell und T-Zell Proliferation führen (Mikhalap *et al.*, 1999). Dieser Defekt verursacht die X-linked Lymphoproliferative Disease (XLP). XLP ist eine relativ seltene Erkrankung. Seit 1978 wurden 300 Patienten registriert. Die Mortalitätsrate beträgt allerdings bis zum 40. Lebensjahr 100 % (Morra *et al.*, 2001). Ähnliche Funktionen wie SAP kann in Makrophagen, DC's und NK-Zellen sowie in einigen B-Zellen, nicht jedoch in thymusgereiften Zellen auch das Protein EAT-2 übernehmen (Veillette, 2002).

CD150 ist mit Protein Tyrosin und Serin/Threonin Kinasen assoziiert, die eine Phosphorylierung *in vitro* und *in vivo* bewirken, besonders nach BCR cross-linking (Mikhalap *et al.*, 1999). Die Stimulation von SLAM führt zu einer SAP vermittelten Phosphorylierung von SLAM über FynT, eine Src Tyrosinkinase, die SLAM an einer von SAP verschiedenen Bindestelle bindet. Diese Phosphorylierung löst die Phosphorylierung anderer Proteine, wie Dok1, Dok2 und Shc, aus.

Ein weiteres Protein mit besonderer Bedeutung in der SLAM Signalleitung ist SHP-2, eine Protein Tyrosin Phosphatase, die phosphoryliertes SLAM in Abwesenheit von SAP bindet. Durch die höhere Affinität von SAP zu SLAM wird die Bindung von SHP-2 verhindert. SHP bindet an Y281 und Y327, wie auch SAP. Auf CD4⁺, CD8⁺ und TH₁ führt CD3 Stimulation zur Downregulation von SAP. Die variable Verteilung von SLAM und SAP in verschiedenen Zellstadien hat eine funktionelle Rolle in der Signalregulation.

Die SAP-Expression ist gering in der frühen Phase der T-Zell Aktivierung und stärker in der späten Phase (Morra *et al.*, Review). SAP bindet 14 AS an Y281 des zytoplasmatischen Endes von SLAM in Abwesenheit von Phosphorylierung. Eine Mutation in R32 eliminiert die Bindung von unphosphoryliertem SLAM. Die Bindung an Y327 ist Phosphotyrosin abhängig.

SLAM bindet neben SAP auch die PTK Fgr und die Inositol Phosphatase SHIP, die ebenfalls zur Regulation der B-Zell-Proliferation beitragen (Mikhalap *et al.*, 1999).

Sowohl SAP/DSHP (Nichols *et al.*, 1998) als auch CD150 (Pinchouk *et al.*, 1988) sind in den Wachstumszentren von B-Zellen und B-Zelllymphomen zu finden, was auch darauf hindeutet, dass CD150 das normale B-Zellwachstum reguliert.

Demnach reguliert CD150 BZR (B-Zell-Rezeptor) Signalketten, was auch bei anderen Korezeptoren die ebenfalls nach BZR-Ligation phosphoryliert werden, wie CD22 und CD19 (DeFranco *et al.*, 1997). Diese Phosphorylierung wird über die Tyrosinkinase FynT erreicht. Das phosphorylierte Ende von SLAM kann die Src Kinase Lyn binden, wobei diese Interaktion möglicherweise auch indirekt über

SHIP erfolgt. SHIP bindet ebenfalls das Tyrosin-phosphorylierte Ende von SLAM (Mikhalap *et al.*, 1999). Anders als die meisten 5'Phosphatasen hydrolysiert SHIP selektiv das 5'Phosphat sowohl von IP4 (Inositol-1,3,4,5-Tetrphosphat) als auch von PIP3 (Phosphatidylinositol-3,4,5-Triphosphat), zwei Inositol Phosphatasen, die mit der Signaltransduktion in Verbindung stehen (Mikhalap *et al.*, 1999). SLAM bindet nicht nur an SHIP, sondern löst auch dessen Dephosphorylierung aus. SHIP wird Tyrosin-Phosphoryliert nach Stimulation über Zytokine, IgE Rezeptoren oder Koligation des BZR mit Fc γ RIIB (Crowley *et al.*, 1996; Liu *et al.*, 1994; Ono *et al.*, 1996; Osborne *et al.*, 1996). Die Phosphorylierung von SHIP an Tyr917 und Tyr1020 wird für die Bindung durch Shc mit deren PTB Domäne benötigt. Des weiteren ist die SH2 Domäne von SHIP notwendig, um SHIP an die Zellmembran zu transportieren, zur Phosphorylierung und für die Rolle von SHIP in der Zellentwicklung. Zusammengefasst ist also die Phosphorylierung von SHIP notwendig für seine Funktion.

Gemäß diesem Modell reduziert die Dephosphorylierung von SHIP durch SLAM dessen Aktivität. Die CD150 vermittelte Dephosphorylierung von SHIP geschieht auch bei Aktivierung von CD40 und/oder CD95. CD150 Bindung fördert CD95/Fas-vermittelten Zelltod und erhöht den SHIP-Dephosphorylierung vermittelten Zelltod. Dies kann geschehen durch Hydrolyse von PIP3, Aktivierung von Akt (die eine Apoptose verhindern kann) oder durch Phosphorylierung von BAD, einem Mitglied der apoptosefördernden Bcl-2 Familie (Mikhalap *et al.*, 1999).

5.3 SLAM als Rezeptor für Masernviren

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass WTFb an CHO-SLAM Zellen bindet (**Abb. 4-18**). Der Impfstamm Edm hat hohe Affinität zu CHO-CD46 Zellen und eine geringere Affinität zu CHO-SLAM Zellen. Die Bindung von WTFb an SLAM liegt deutlich über derjenigen von Edm an SLAM, sie ist jedoch schwächer als die Bindung von Edm an CD46. Da demnach SLAM ein Rezeptor sowohl für MV Wildtyp als auch Impfstamm ist, kann die Bindung auch durch monoklonale Antikörper gehemmt werden. Auf B95a Zellen, die kein MV-rezeptorfähiges CD46 exprimieren, kann die Bindung sowohl der Wildstämme WTFb und Wü5679 als auch der Impfstämme Edm und Edm-Zag fast vollständig inhibiert werden. Da der gegen B95a-CD46 gerichtete Antikörper 10/88 keinen Effekt auf die Virusbindung von Wildtyp oder Impfstämmen hat zeigt, dass SLAM der einzige Rezeptor auf B95a Zellen ist (**Abb. 4-2**).

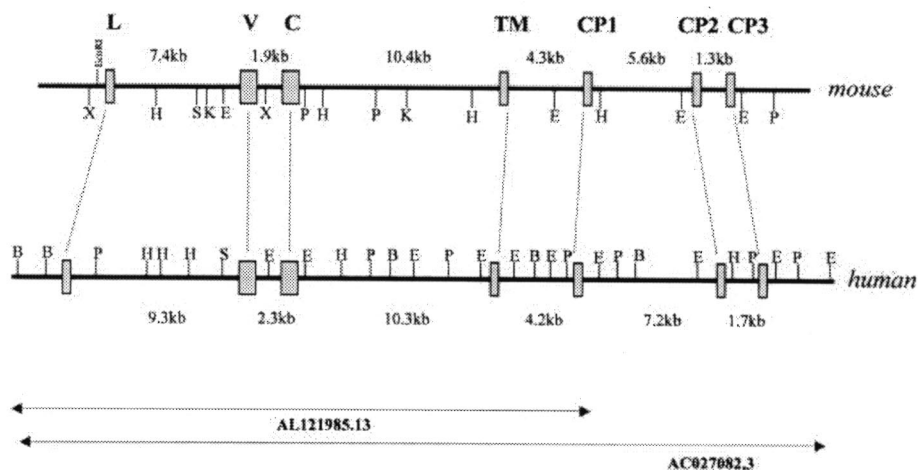


Abb. 5-4 SLAM Genom. Vergleich zwischen humanem Genom und Mausgenom. Das SLAM Genom ist in 7 Exons aufgeteilt.

Auf Zellen die zusätzlich CD46 exprimieren, wie humane PBL, wird die Bindung der Vakzine-Viren nicht durch SLAM Antikörper behindert (**Abb 4-15**). Dies könnte an einer stärkeren Affinität von Edm an CD46 im Vergleich zu SLAM liegen (Santiago *et al.*, 2002). Aber auch die Bindung von WTFb und Wü5679 wird durch anti-CD46 Antikörper nicht beeinflusst. Eine starke Inhibition der Bindung von WTFb an PBL konnte nur durch anti-SLAM Antikörper ausgelöst werden (**Abb. 4-14**). Die Bindung von WTFb und Wü5679 ist auf SLAM beschränkt, während Edm und Edm-Zag eine starke Affinität zu CD46 aufweisen, aber auch mit SLAM interagieren. Dies bestätigen auch die durchgeführten Infektionsstudien. Infektion mit Edm oder WTFb löst eine starke Synzytienbildung auf CHO-SLAM Zellen aus,

nicht dagegen auf CHO Zellen (**Abb.4-19; 4-20**). Demnach vermittelt SLAM als zellulärer Rezeptor die MV -Bindung, -Aufnahme und -Synzytienbildung sowohl für MV WTFb, als auch Edm. Beide Rezeptoren können dabei unabhängig voneinander verwendet werden. Diese Ergebnisse konnten von Tasuo *et al.*, 2000 bestätigt werden.

Einige Proteine der CD-2 Ig Superfamilie besitzen eine begrenzte Homologie zu CD150: CD48 zu 26 %, LFA-3 (CD58) zu 17 % und 2B4 zu 28 % (Cocks *et al.*, 1995). Diese Ähnlichkeit reicht jedoch nicht aus, um als zellulärer Rezeptor für MV zu dienen (**Abb. 4-11**). Auch Maus-SLAM besitzt eine große Ähnlichkeit zur Struktur des humanen SLAM (Wang *et al.*, 2001) von ca. 60 %, dient aber nicht als Rezeptor für MV (Ono *et al.*, 2001), was auch erklären kann, dass Mäuse nicht mit MV infizierbar sind.

5.4 Rezeptorbenutzung verschiedener MV-Stämme

Sowohl der MV-Stamm WTFb, als auch Edm können SLAM als zellulären Rezeptor verwenden. Dazu wurde untersucht, ob SLAM ein Rezeptor für alle Masernviren darstellt. Für ein Verstehen der MV Pathogenese ist dies von entscheidender Bedeutung. Klinische Isolate wie JW und IV binden mit geringer Affinität an CD46 und die Infektion von PBMCs der Isolate FV93 und BCL94 kann nicht durch CD46 Antikörper gehemmt werden (Manchester *et al.*, 2000). Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass MV Wildtypen aus Rachenabstrichen akut infizierter Patienten. SLAM als Rezeptor verwenden (Ono *et al.*, 2001). Aus diesem Grund wurde die Rezeptorbenutzung von 28 verschiedenen MV-Stämmen untersucht, darunter klinische Isolate und rekombinante Viren, die im Labor verfügbar waren. Durch den Vergleich von Synzytienbildung nach Infektion auf CHO-CD46-, CHO-SLAM- und CHO-Zellen ist ein direkter Vergleich der Rezeptorbenutzung vor dem selben zellulären Hintergrund möglich. Die Synzytienbildung bei CHO-SLAM Zellen verläuft sehr schnell. Dies zeigt sich in den deutlich größeren Synzytien verglichen mit CHO-CD46 Zellen. Da SLAM ein Selbstligand ist (Mavoddatt *et al.*, 2000) mit einer konstanten Affinität von 0,1 mM (Dunnonen *et al.*, 1997), stehen die Zellen in einem sehr engen Kontakt zueinander. Zum Teil ist dies als Adhäsionsplaque erkennbar (**Abb. 4-36**). Adhäsionsplaques sind Anreicherungen von SLAM an den Kontaktstellen der Zelloberfläche zweier Zellen. Andere Proteine der SLAM-Signalkette werden verstärkt in diese Bereiche (Immunologische Synapse) rekrutiert (Howie *et al.*, 2002). Der Kontakt der MV Proteine F und H vermittelt möglicherweise eine sehr schnelle Verschmelzung der Zellen an den Adhäsionsplaques. Alle MV-Stämme, Isolate und rekombinante Viren infizierten B95a Zellen und CHO-SLAM Zellen. Dies verdeutlicht, dass alle

Viren SLAM als Rezeptor verwendeten. CD46 dagegen diene zusätzlich zu SLAM als Rezeptor für einige Impfstamm Viren wie Edm, Edm-Zagreb, Aik-C und genetisch ähnlichen Stämmen (**Tab. 4-1**). Das Wildtyp-Isolat WTFb welches auf BJAB Zellen gezüchtet wurde, infizierte ausschließlich CHO-SLAM Zellen (**Abb. 4-22**). Nach Adaption des Virus an Vero-Zellen (Rima *et al.*, 1997) konnte die Infektion dieses Stammes mit CD46 Antikörpern verhindert werden. Zudem zeigten die Stämme WTFb sowie WTFv keine Downregulation von CD46 (Bartz *et al.*, 1998). Der MV-Stamm WTFv infiziert sowohl CHO-CD46, als auch CHO-SLAM Zellen (**Abb. 4-22**). WTFv kann also beide Proteine als Rezeptor verwenden.

Früher wurde veröffentlicht, dass die Aminosäure (AS) an Stelle 481 einen starken Einfluß auf die CD46 Downregulation, CD46-abhängige Synzytienformation und Hämagglutination hat (Bartz *et al.*, 1996; Hsu *et al.*, 1998; Lecouturier *et al.*, 1996). Die Rekombinante MV(WTF-H 481 N-Y)Edm enthält ebenfalls das H-Protein von WTF. Eine Punktmutation an Nukleotid-Position 1441 von Adenin zu Thyminidn führt jedoch zu einem Aminosäurewechsel vom Asparagin (WTF) zu Tyrosin (Edm). Diese Mutation ermöglicht die Interaktion des Virusproteins mit CD46. Ich konnte zum ersten Mal zeigen, dass die Rekombinanten, (**Tab.4-1 Nr.24-26**) die Edm H exprimieren, sowohl CHO-CD46 als auch CHO-SLAM Zellen infizieren. Im Gegensatz dazu infizierten die rekombinanten Viren mit WTF-H Protein (**Nr.25 und 27**) ausschließlich SLAM exprimierende Zellen. Die Punktmutation der Rekombinante MV(WTF-H 481 N-Y)Edm (**Nr.28**) mit Mutation an AS Position 481 von WTF-H zu Edm-H bewirkt eine Veränderung in der Rezeptorbenutzung. Neben der Infektion von CHO-SLAM Zellen wurden zudem CHO-CD46 Zellen infiziert (**Abb. 4-24**). Dies beweist, dass die Punktmutation im infektiösen Virus eine Veränderung in der Rezeptorbenutzung hervorruft. Die Daten zeigen, dass SLAM als Rezeptor für alle getesteten Masernviren dient. Die Mutation an Stelle 481, die entscheidend für die CD46-Rezeptorbenutzung ist, hat keinen Einfluss auf die Rezeptorbenutzung von SLAM. Die Aminosäure 481 liegt nach dem Strukturmodell des H-Proteins nach Langedijk *et al.*, 1997 am Boden einer kleinen Falte im vierten Propeller des globulären Kopfes. Die Konformationsänderung scheint nach dieser Studie örtlich begrenzt zu sein und bezieht nicht den gesamten Kopf mit ein. Möglicherweise bindet SLAM an anderer Stelle an MV-H als CD46.

5.5 SLAM Downregulation von der Zelloberfläche

Die Downregulation von Virus Rezeptoren ist ein bekanntes Phänomen, dass für einige Viren, wie HIV (Klatzmann *et al.*, 1990) und HHV-6 (Santiago *et al.*, 1999) beschrieben wurde. Auch CD46 wird nach der Infektion mit MV Edm von der Zelloberfläche herunterreguliert (downreguliert), nicht allerdings nach Infektion mit Wildtyp Viren (Lecounturier *et al.*, 1996). In dieser Arbeit wurde auch untersucht, ob der MV-Rezeptor SLAM von der Zelloberfläche downreguliert wird.

Da SLAM in Signaltransduktionsprozesse (**5.1**) integriert ist, könnte die Virus Bindung mit nachfolgender Downregulation des Rezeptors von der Zelloberfläche entscheidende Bedeutung für die Pathogenität von MV haben. Wie bereits für CD46 beschrieben (Krantic *et al.*, 1995, Schneider-Schaulies J. *et al.*, 1996) zeigt SLAM eine schnelle Rezeptormodulation von der Zelloberfläche. Die Infektion mit WTFb führt zu einer vollständigen Herabregulation von der Zelloberfläche von CHO-SLAM- (**Abb. 4-25**), BJAB-Zellen (**Abb. 4-26**) und stimulierten PBL (**Abb. 4-27**). Zudem wurde eine Rezeptor-Modulation auch ohne Infektion nach Kontakt mit MV-Glykoproteinen herbeigeführt. Nach Kontakt von persistent mit WTFb infizierten BJAB Zellen wurde sowohl auf CHO-SLAM Zellen (**Abb. 4-28**) als auch auf B95a (**Abb. 4-29**) eine schnelle Rezeptormodulation ausgelöst. Auf B95a Zellen konnte dagegen keine Downregulation von SLAM durch persistent mit Edm infizierten Zellen hervorgerufen werden. Möglicherweise ist die Bindung zwischen Edm und SLAM zu gering, um eine Signalkette auszulösen. Für WTFb konnte gezeigt werden, dass der Kontakt von Virus und Zellen in einer Verdünnung von 1:40 ausreichend für eine Downregulation des Rezeptors ist (**Abb. 4-30**). Auch der Kontakt mit UV-inaktiviertem Virus (WTFb) führt zu einer Rezeptor-Modulation (**Abb. 4-31**). Diese Ergebnisse zeigen, dass Zell-Zell Kontakt durch Interaktion von Wildtyp MV-H und SLAM auch in Zellen die kein MV-H Protein exprimieren, eine SLAM Downregulation bewirkt.

Schon bei einer Infektion mit MOI = 0,5 ist im Fluoreszenzmikroskop eine Agglutination von SLAM innerhalb der Zellen sichtbar (**Abb.4-35 B**). Die Agglutination verstärkt sich deutlich während der Synzytienbildung (**Abb.4-35 C+D**). Dabei findet eine Anreicherung von SLAM um den Zellkern herum statt. Dies konnte sowohl nach Infektion und anschließender SLAM Färbung, als auch bei Beobachtung von EGFP markiertem SLAM nachgewiesen werden. Dies lässt zwei Mechanismen der Downregulation zu. Entweder wird SLAM im ER (Endoplasmatisches Retikulum) zurückgehalten oder SLAM wird von der Oberfläche zurück ins ER transportiert. An der Zelloberfläche ist zudem ein Capping der SLAM Proteine zu erkennen, ausgelöst durch den 5C6 Antikörper allein (**Abb.4-34**). Dies zeigt, dass SLAM auch unter normalen Bedingungen, also ohne MV Infektion, regelmäßig neu synthetisiert wird.

Demnach ist ein Zurückhalten von SLAM im ER nach einer MV-Infektion wahrscheinlich und die Downregulation ein Effekt, der auf den gestörten Transport vom ER an die Zelloberfläche zurückzuführen sein könnte. Die beschriebenen Ergebnisse konnten durch Tanaka *et al.*, 2002 bestätigt werden. Zudem konnten sie zeigen, dass allein das MV-H Protein ausreicht, um eine SLAM Downregulation zu induzieren. Die japanische Arbeitsgruppe hat dazu Zellen mit MV-H transfiziert. SLAM Downregulation wurde in Zellen gefunden, die das MV-H Protein exprimierten, aber auch in einem Teil der Zellen die kein MV-H exprimierten. Auch diese Experimente zeigen, dass das H-Protein und SLAM nicht in derselben Zelle exprimiert werden müssen, um eine Downregulation zu bewirken. Für die SLAM Downregulation sind mindestens zwei Mechanismen denkbar. Zum einen die Koexpression des H-Proteins und SLAM in der selben Zelle. Dafür spricht die ähnliche Verteilung von SLAM und MV-H Protein in den Fraktionen der Dichtegradientenzentrifugation (**Abb. 4-37**). Die Ergebnisse machen jedoch noch nicht hinreichend deutlich, ob es sich um eine Kolokalisation von SLAM und MV-H handelt. Dennoch dürfte die Infektion der Zelle mit Expression des MV-H Proteins die Downregulation hinreichend fördern. Zum anderen durch Zell-Zell Kontakt nach Interaktion des H-Proteins mit SLAM an der Zelloberfläche. Tanaka *et al.*, 2002 beschreiben eine effektivere Downregulation von SLAM mit Edm als mit einem Wildtyp Stamm, sowohl nach Transfektion des H-Proteins, als auch nach Zell-Zell-Kontakt. Dies spiegelt die schwächere Bindung des KA Stammes im Vergleich zu Edm wider. Die Bindung scheint also im Verhältnis zur Downregulation zu stehen. Es zeigt aber auch die Unterschiede zwischen den einzelnen MV-Stämmen. Die Stärke der Downregulation macht jedoch keine Aussage über die Verwendung als Rezeptor. Auch das Rinderpest Virus bewirkt eine Downregulation von CD46, benutzt dieses aber nicht als Rezeptor (Galbraith *et al.*, 1998). Dennoch zeigen die Ergebnisse, dass eine Korrelation besteht zwischen der Benutzung von SLAM oder CD46 als Rezeptor und deren Downregulation. Da SLAM eine bedeutende Funktion als kostimulatorisches Molekül hat, ist es wahrscheinlich, dass die Downregulation auch die Aktivierung von Lymphozyten beeinflusst, die auch eine Rolle in der MV induzierten Immunsuppression spielen könnte. In diesem Zusammenhang ist insbesondere von Bedeutung, dass die Downregulation von SLAM auch uninfizierter Zellen über Zell-Zell Kontakt vermittelt wird. Sowohl SLAM als auch CD46 scheinen aber keinen Einfluss auf die kontaktvermittelte Proliferationsinhibition zu haben. Der Kontakt von MV oder UV inaktivierten infizierten Zellen führt nicht zur Proliferationsinhibition der kontaktierenden Zellen (Responder Zelle) (Schlender *et al.*, 1993). Die Expression von SLAM oder CD46 auf den Responder-Zellen hatte keinen Einfluss auf die Induktion der Proliferationsinhibition weder durch WTFb noch Edm (Erlenhoefer *et al.* 2001). Die Tatsache, dass SLAM keinen direkten Einfluss auf die kontaktvermittelte Proliferationsinhibition hat,

schließt jedoch dessen Beteiligung an anderen virusbedingten Erscheinungen der Immunantwort nicht aus.

5.6 Schlußfolgerungen

Anders als die Gewebeverteilung von CD46 stimmt die Verteilung von SLAM besser mit der MV Pathologie im humanen System überein. Aber nicht alle mit MV infizierbaren Zellen exprimieren auch SLAM. Auf Monozyten wird die Expression von SLAM nach Infektion mit MV ausgelöst (Minagawa *et al.*, 2001). Auch Endothel- Zellen, sowie Neuronen, Oligodendrozyten und Astrozyten sind mit MV infizierbar, exprimieren kein SLAM (McQuaid&Cosby, 2002). Für HUVECs (human umbilical vein cells) und HBMECs (brain microvascular endothelial cells) konnte in unserer Arbeitsgruppe gezeigt werden, dass sie keine SLAM exprimieren, auch nach Behandlung mit inflammatorischen Zytokinen oder MV (Andres *et al.*, in Press). Dennoch lassen sich humane Ec's mit Wildtypstämmen Wü4797 und Wü5679 infizieren, die CD46 nicht als Rezeptor verwenden (**Abb. 4-22**). Die Ausbreitung im Körper kann über SLAM exprimierende Zellen erfolgen, wie Dendritische Zellen aber auch B und T-Zellen. SLAM als Rezeptor kann nicht alle Ergebnisse erklären, wie die Infektion des Respiratorischen Epithels, aber auch vaskulärer Endothelzellen. Obwohl für viele Zellen keine SLAM Expression beschrieben wurde, ist eine tatsächliche SLAM Expression in sehr geringer Menge, die sich nicht nachweisen lässt, aber zur Infektion genügt, durchaus denkbar. Auch die Existenz weiterer MV-Rezeptoren oder andere der Virusaufnahme-Mechanismen könnten eine Rolle spielen. Zur Erklärung der *in vivo* Pathogenese besteht auch die Möglichkeit, dass MV aus Speichelproben zwar kein CD46 als Rezeptor verwenden kann, dass aber innerhalb der Gewebe von MV Patienten Viren auftreten, die sehr wohl CD46 als Rezeptor verwenden können und dadurch auch andere Gewebetypen infizieren.

Die Aktivierung von SLAM durch den monoklonalen AK A12 verursacht eine Zytokinproduktion in Richtung TH₀/TH₁ Antwort der CD4 T-Zellen (Aversa *et al.*, 1997). Während der akuten MV Infektion ist *in vivo* und *in vitro* eine TH₂ Polarisation in der Zytokinantwort vorherrschend, während eine TH₁ Antwort unterdrückt wird (Griffin *et al.*, 1993; Aversa *et al.*, 1997). SLAM Downregulation könnte auch hier eine Rolle spielen, indem die Rezeptormodulation die TH₁ Zytokinantwort verringert.

Es wurde berichtet, dass bei Burkitt Lymphom Patienten und Hodgkin Disease eine Tumorrückbildung nach MV Infektion zu finden ist (Bluming *et al.*, 1971, Taqi *et al.*, 1981). Auch diese Entdeckungen sind durch SLAM als Rezeptor erklärbar. EBV- transformierte Zellen exprimieren große Mengen von SLAM und sind dadurch bei einem Burkitt-Lymphom schnell infizierbar. Wahrscheinlich

exprimieren auch Tumorzellen bei Hodgkin Disease verstärkt SLAM und werden deshalb durch MV zerstört.

Obwohl nicht ausgeschlossen werden kann, dass neben CD46 und SLAM noch andere Moleküle existieren, die als zelluläre Rezeptoren für MV in Frage kommen, scheint SLAM ein Hauptrezeptor zu sein. Wenige Viren aus Speichelproben verwenden CD46 als Rezeptor (Ono *et al.*, 2002), zudem sind einige Passagen nötig, um MV aus Vero -Zellen zu isolieren. Die Verwendung von CD46 als Rezeptor durch einige MV-Stämme scheint daher eher eine *in vitro* Adaptation, als eine *in vivo* Eigenschaft dieser Stämme zu sein. Der MV Stamm Edm hat die Forschung der Vergangenheit beherrscht. Da jetzt bekannt ist, dass der Edm Stamm nicht repräsentativ zu sein scheint, sollten für weitere Studien der MV Pathogenese ausschließlich Stämme verwendet werden, die SLAM und nicht CD46 als Rezeptor verwenden. Dazu zählen Stämme die auf SLAM exprimierenden Zellen passagiert wurden, wie BJAB aber auch B95a. Auch wenn hinsichtlich der Rezeptorbenutzung von Masernviren noch einige Fragen offen blieben, konnte mit der Entdeckung von SLAM als MV-Rezeptor ein großer Schritt im Verständnis der MV-Pathogenese getan werden.

6 Zusammenfassung

Das Masernvirus (MV) interagiert mit zellulären Rezeptoren auf der Oberfläche von peripheren Blut-Lymphozyten (PBL), die Virus-Bindung und -Aufnahme vermitteln. Wir konnten einen monoklonalen Antikörper mAK 5C6 selektieren, der gegen die Zelloberfläche von B95a Zellen gerichtet ist, die mit MV gut infizierbar sind. Der Antikörper 5C6 inhibiert sowohl die Bindung, als auch die Infektion mit MV Wildtyp- und Vakzine-Stämmen. Ich verwendete eine retrovirale Genbank als Quelle für humane Milz mRNA und Proteine, um ein Screening nach Rezeptoren mit Antikörpern durchzuführen. Mit Hilfe des Antikörpers 5C6 wurde, unter Verwendung von Magnetbeats und FACS-Sortierung, ein erfolgreiches Screening Rezeptor-exprimierender Zellen durchgeführt. Das von mAK 5C6 erkannte Molekül konnte kloniert und als signaling lymphocytic activation molecule (SLAM; CD150) identifiziert werden.

Zur Untersuchung der Rezeptorbenutzung verschiedener MV-Stämme wurden CHO-Zellen, die entweder rekombinantes CD46 oder SLAM exprimierten, mit 28 Masernvirusstämmen infiziert. Unter den getesteten Viren befanden sich sowohl Vakzine-Stämme, Wildtyp-Stämme mit verschiedener Passagierung und rekombinante Viren. Dabei konnte gezeigt werden, dass SLAM ein Rezeptor für MV ist, der sowohl Virusaufnahme und Synzytienbildung für alle getesteten Masernvirusstämmen vermittelt. Vor allem Vakzine- und laboradaptierte-Stämme, aber auch eine kleine Fraktion der getesteten Wildtypstämme, konnten sowohl CD46 als auch SLAM verwenden. Durch Verwendung rekombinanter Viren konnte ich zeigen, dass der einzelne Aminosäureaustausch im Hämagglutinin (H) Protein an Position 481 Asn/Tyr (H481NY) determiniert, ob das Virus CD46 verwendet. Der Aminosäureaustausch hat keinen Effekt auf die Verwendung von SLAM als Rezeptor was andeutet, dass die Bindungsstelle von SLAM und CD46 unterschiedlich ist.

Wie bereits für CD46 beschrieben, konnte eine schnelle Rezeptormodulation sowohl auf infizierten als auch uninfizierten Zellen nach Kontakt der MV-Glykoproteine mit SLAM, festgestellt werden. Dabei zeigte sich eine kontaktvermittelte Downregulation nach Vermischung SLAM-positiver Zellen mit persistent infizierten BJAB Zellen oder UV-inaktiviertem Virus. SLAM wird schnell von der Zelloberfläche SLAM exprimierender Zelllinien, wie CHO-SLAM, B95a, BJAB, sowie von peripheren Blutlymphozyten (PBL) herunterreguliert.

Zusammengefasst: mit SLAM (CD150) wurde ein neuer zellulärer Rezeptor für alle Masernvirusstämmen identifiziert.

7 Summary

Measles virus (MV) interacts with cellular receptors on the surface of peripheral blood lymphocytes (PBL) which mediate virus binding and uptake. We selected a monoclonal antibody (Mab 5C6) directed to the surface of highly MV-susceptible B cells (B95a), which inhibits binding to and infection of cells with MV wild-type and vaccine-strains.

I used a retroviral gene bank as a source for human splenic mRNAs and proteins, which made it possible to screen with antibodies and to screen for receptor positive cells. By using the suitable antibody 5C6 I successfully screened for receptor expressing cells using magnetic beads and FACS sorting. I cloned and identified the Mab 5C6 recognized molecule as Signaling Lymphocytic Activation Molecule (SLAM; CD150).

In order to investigate which measles virus strains may use CD46 and /or CD150 as receptors, CHO cells expressing either recombinant CD46 or SLAM were infected with a panel of 28 MV-strains including vaccine strains, wild-type strains with various passage histories and recombinant viruses. I found that SLAM served as a receptor conferring virus uptake and syncytium formation for all MV-strains tested. Predominantly vaccine and laboratory adapted strains, but also a minor fraction of wild-type strains tested, could utilize both CD46 and SLAM. Using recombinant viruses it was demonstrated that the single amino acid exchange in the haemagglutinin (H) protein at position 481 Asn/Tyr (H481NY) determines whether the virus can utilize CD46. The amino acid alteration has no effect on the usage of SLAM as receptor, and as such demonstrates that the binding sites for SLAM and CD46 are distinct.

As described for CD46 a rapid receptor modulation was induced by contact of MV glycoproteins with SLAM on infected and uninfected cells. A contact-mediated downregulation was measured by mixing persistently infected BJAB cells or UV-inactivated viruses with uninfected SLAM-positive cells. SLAM is rapidly modulated from the cell surface of all SLAM expressing cell-lines including CHO-SLAM, B95a, BJAB as well as peripheral blood lymphocytes (PBL).

In conclusion, I identified SLAM (CD150) as a new cellular receptor for all measles virus strains.

8 Literaturverzeichnis

Aaby, P., Samb, B., Simondon, F., *et al.* 1993

Divergent mortality for male and female recipients of low-titre and high-titre measles vaccines in rural Senegal. *Am. J. Epidemiol.* 138:746-755.

Albritton, L.M. 1997

Efficient transfection of fibroblast and epithelial cells with SuperFekt Transfektion Reagent. *QIAGEN News* 2;4

Arnberg, N., P. Pring-Akerblom, *et al.* 2002

Adenovirus type 37 uses sialic acid as a cellular receptor on Chang C cells." *J Virol* **76**(17):8834-41.

Aruffo, A., Seed, B. 1987

Molecular cloning of a CD28 cDNA by a high-efficiency COS cell expression system. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 84:8573-8577

Atkinson, W. L., Orenstein, W. A., and Krugman, S. 1992

The resurgence of measles in the United States, 1989-1990. *Annu. Rev. Med.* 43:451-463.

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

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

Aversa, G., J. Carballido, *et al.* 1997

SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses." *Immunol Cell Biol* **75**(2): 202-5.

Barclay N., M. L. Birkeland, M. H. Brown, A. D. Beyers, S. J. Davis, C. Somoza, A. F. Williams 1993.

The Leukocyte Antigen Facts Book. Academic Press, London.

Bartz, R. 1998

Differentielle Benutzung von Rezeptoren durch verschiedene Masernvirus-Isolate. Dissertation, Universität Würzburg.

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

Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *J. Virol.* 224:334-337.

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

Mapping amino acids of the measles virus hemagglutinin responsible for receptor (CD46) downregulation. *J. Virol.* 224:334-337.

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.

Bellini, W.J., Englund, S., Rozenblatt, S., Arnheiter, H., Richardson C.D. 1985 Measles virus P gene codes for two proteins J. Virol. 53:908-919

Bergholz, C. M., Kiley, M. P., Payne, F. E. 1975

Isolation and characterization of temperature-sensitive mutants of measles virus. J. Virol. 16:192-202.

Bieback, K., E. Lien, *et al.* 2002

Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling. J Virol **76**(17): 8729-36.

Billeter, M. A., and Cattaneo, R. 1991

Molecular biology of defective measles viruses persisting in the human central nervous system. In: Kingsbury D. (ed) The paramyxoviruses. New York: Plenum; 323-245.

Blumberg, B. M., Leppert, M. and Kolakofsky, D. 1981

Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication. Cell, 23:837-845.

Bluming, A. Z. and J. L. Ziegler 1971

Regression of Burkitt's lymphoma in association with measles infection. Lancet **2**(7715): 105-6.

Brooksbank, R. (2000). SLAM the door on measles. Mol Med Today **6**(11): 414.

Buckland, R., and Wild, T. F. 1997

Is CD46 the cellular receptor for measles virus? Vir. Res. 48:1-9.

Cattaneo, R., Rebmann, G. Baczko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A. 1987

Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. Virology 160:523-526.

Cocks, B. G., C. C. Chang, *et al.* 1995 A novel receptor involved in T-cell activation." Nature **376**(6537): 260-3.

Crowley, M. T., S. L. Harmer, *et al.* 1996

Activation-induced association of a 145-kDa tyrosine-phosphorylated protein with Shc and Syk in B lymphocytes and macrophages. J Biol Chem **271**(2): 1145-52.

Curran, J., DeMelo, M., Moyer, S., Kolakowsky, D. 1991

Charakterisation of the Sendai virus V protein with an anti-peptide antiserum. Virology 184:108-116

D'Souza, M.P. 1996

Chemokines and HIV-1 second receptors. Nature Medicine 2:1293-1300 Different membrane cofactor protein (CD46) isoforms protected transfected cells against antibody and complement mediated lysis. Transpl. Immunol 1(2):101-8

DeFranco, A. L. 1997

The complexity of signaling pathways activated by the BCR. *Curr Opin Immunol* **9**(3): 296-308.

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

The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston-strain). *Cell* **22**;75(2):295-305

Enders J. F. 1962

Measles virus: historical review, isolation and behavior in various systems. *Am J. Dis. Child.* **103**: 282-287.

Enders, J. F., and Peebles, T. C. 1954

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

Erlenhoefer, C., W. J. Wurzer, *et al.* 2001

CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol* **75**(10): 4499-505.

Erlenhofer, C., W. P. Duprex, *et al.* 2002

Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J Gen Virol* **83**(Pt 6): 1431-6.
Escoffier, C., Gerlier, D. 1999 Infection of chicken fibroblasts by measles virus: adaptation at the virus entry level *J. Virol.* **73**(6) : 5220-5224

Esolen, L.M., Ward, B.J., Moench, T.R. und Griffin, D.E. 1993

Infection of monocytes during measles. *J. Infect. Dis.*, **168**, 47-52.

Falkenstein, E., Schmieding, K., Lange, A., Meyer, C., Gerdes, D., Welsch, U., Wehling, M. 1998

Localization of a putative progesterone membrane binding protein in porcine hepatocytes. *Cell Mol Biol (Noisy-le-grand)* **Jun**;44(4):571-8

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. 1996

HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven transmembrane, G protein coupled receptor. *Science* **272**:872-877.

Firsching, R. 1999 Untersuchung der Rezeptorbenutzung und- Modulation durch Masernvirus Impf- und Wildstämme. Dissertation, Universität Würzburg.

Firsching, R., Buchholz, C.J., Schneider, U., Cattaneo, R., Ter Meulen, V., Schneider-Schaulies, J. July 1999 Measles virus spread by cell-cell contact: Uncoupling of contact-mediated receptor (CD46) downregulation from virus uptake. *J. Virol.* **73** (7)

Forthal D. N., J. Blanding, S. Aarnaes, E. M. Petersen L. M. de la Maza, L. M. und J. G. Tilles 1993

Comparison of different methods and cell lines for isolating measles virus. *Clinical. Microbiol.* 31: 695-697.

Fraser, C. C., D. Howie, *et al.* 2002

Identification and characterization of SF2000 and SF2001, two new members of the immune receptor SLAM/CD2 family." *Immunogenetics* **53**(10-11): 843-50.

Galbraith, S. E., A. Tiwari, *et al.* 1998

Morbillivirus downregulation of CD46. *J Virol* **72**(12): 10292-7.

Garenne, M., Leroy, O., Beau, J. P., and Sene, I. 1991

Child mortality after high-titre measles vaccines: prospective study in Senegal. *Lancet* 338:903-907.

Gibbs, E. P., Gibbs, E. L., Carpenter, P. R., Spies, H. W. 1959

Electroencephalographic abnormality in uncomplicated childhood diseases. *JAMA* 171:1050-1055.
Golovkina, T.V., Dzuris, J., van den Hoogen, B., Jaffe, A.B., Wright, P.C., Shelagh, M.C., Ross S.R. 1998.

Gould, E. A., Cosby, S. L., Shirodaria, B. V. 1976

Salt dependent haemagglutinating measles virus in SSPE. *J. Gen. Virol.* 33:139-142.

Grandgirard, D., Studer, E., Monney, L., Belser, T., Fellay, I., Borner, C., Michel, MR. 1998

Alphaviruses induce apoptosis in Bcl-2-overexpressing cells: evidence for caspase-mediated, proteolytic inactivation of Bcl-2. *EMBO J* Aug 10;17(5):1268-78

Greenstone, H. L., F. Santoro, *et al.* 2002

Human herpesvirus 6 and measles virus employ distinct CD46 domains for receptor function. *J Biol Chem* 8: 8.

Griffin, D. E. and B. J. Ward 1993

Differential CD4 T cell activation in measles. *J Infect Dis* **168**(2): 275-81.

Hamalainen, H., S. Meissner, *et al.* 2000

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

Hanninen, P., Arstila, P., Lang, H., Salmi, A., and Panelius, M. 1980

Involvement of the central nervous system in acute, uncomplicated measles virus infection. *J. Clin. Microbiol.* 11:610-613.

Hashimoto, K., N. Ono, *et al.* 2002 SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. *J Virol* **76**(13): 6743-9.

He, J. 1997

CCR3 and CCR5 are co-receptors for HIV-1 infection of microglia Nature 385: 645-649

Herrler, G., Rott, R., Klenk, H.-D., Müller, H.-P., Shukla, A. K. and Schauer, R. 1985

The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is a neuraminidase. EMBO J. 4:1503

Howie, D., M. Simarro, et al. 2002

Molecular dissection of the signaling and costimulatory functions of CD150 (SLAM): CD150/SAP binding and CD150-mediated costimulation. Blood 99(3): 957-65.

Howie, D., S. Okamoto, et al. 2002

The role of SAP in murine CD150 (SLAM)-mediated T-cell proliferation and interferon gamma production." Blood 100(8): 2899-907.

Hsu, E. C., Sarangi, F., Iorio, C., Sidhu, M. S., Udem, S. A., Dillehay, D. L., Xu, W., Rota, P. A., Bellini, W. J., and Richardson, C. D. 1998

A Single Amino Acid Change in the Hemagglutinin Protein of Measles Virus Determines Its Ability To Bind CD46 and Reveals Another Receptor on Marmoset B Cells. J. Virol. 72:2905-2916.

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

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

Janeway, C.A., Travers, P. 1998

Immunologie, Spektrum Lehrbuch

Jin, L., Brown, D. W. G., Ramsay, M. E. B., Rota, P. A., and Bellini, W. J. 1997

The diversity of measles virus in the United Kingdom, 1992-1995. J. Gen. Virol. 78:1287-1294.

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

A recombinant measles vaccine virus expressing wild-type glycoproteins: consequences for viral spread and cell tropism. J Virol. ;73(8):6903-15.

Kallstrom, H., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., and Jonsson, A. B. 1997

Membrane cofactor protein (MCP or CD46) is a cellular pilus receptor for pathogenic Neisseria. Mol. Microbiol. 25:639-647.

Keiser, C., von Stein, O. Laux, G., Hoffmann, M. 1999

Functional genomics in cancer research: identification of target genes of the Epstein-Barr virus nuclear antigen 2 by subtractive cDNA cloning and High-Throughput differential screening using high-density agarose gels. Electrophoresis 20(2):261-8

Kempe, C. H., and Fulginiti, V. A. 1965. The pathogenesis of measles virus infection. Arch. Ges. Virusforsch. 16:103-128.

Klagge, I. M. and S. Schneider-Schaulies 1999 Virus interactions with dendritic cells. J Gen Virol 80(Pt 4): 823-33.

Klagge, I. M., V. ter Meulen, *et al.* 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(10): 2741-50.

Klatzmann, D. R., J. S. McDougal, *et al.* 1990

The CD4 molecule and HIV infection." *Immunodeficiency Rev* 2(1): 43-66.

Kobune, F., Sakata, H., Sugiura, A. 1990

Krantic, S., C. Gimenez, *et al.* 1995 Cell-to-cell contact via measles virus haemagglutinin-CD46 interaction triggers CD46 downregulation. *J Gen Virol* 76(Pt 11): 2793-800.

Lecouturier, V., Fayolle J., Caballero M., Carabana J., Celma M. L., Fernandez-Munoz, R., Wild, T. F., and Buckland, R. 1996

Identification of Two Amino Acids in the Hemagglutinin Glycoprotein of Measles Virus (MV) That Govern Hemadsorption, HeLa Cell Fusion, and CD46 Downregulation: Phenotypic Markers That Differentiate Vaccine and Wild-Type MV Strains. *J. Virol.* 70:4200-4204.

Lightwood R., R. Nolan 1970

Epithelial giant cells in measles as an aid in diagnosis. *J. Pediatr.* 77: 59-64.

Liszewski, M. K., Post, T. W., and Atkinson, J. P. 1991

Membrane Cofactor Protein (MCP or CD46): Newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Ann. Rev. Immunol.* 9:431-455.

Liszewski, M.K., Tedja, I., and Atkinson, J.P. 1994

Membrane cofactor protein (CD46) of complement. Processing differences related to alternatively spliced cytoplasmic domains. *J. Biol. Chem.* 269:10776-10779.

Liu, L., J. E. Damen, *et al.* 1994 Multiple cytokines stimulate the binding of a common 145-kilodalton protein to Shc at the Grb2 recognition site of Shc." *Mol Cell Biol* 14(10): 6926-35.

Loveland, B. E., Johnstone, R. W., Russel, S. M., Thorley, B. R., and McKenzie, I. F. C.

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

Malvoisin, E., and Wild, F. 1994.

The role of N-glycosylation in cell fusion induced by a vaccinia recombinant virus expressing both measles virus glycoproteins. *Virology* 200:11-20.

Manchester, M., A. Valsamakis, *et al.* 1995

Measles virus and C3 binding sites are distinct on membrane cofactor protein (CD46). *Proc Natl Acad Sci U S A* 92(6): 2303-7.

Manchester, M., D. Nanche, *et al.* 2000

CD46 as a measles receptor: form follows function." *Virology* 274(1): 5-10.

McQuaid, S. and S. L. Cosby 2000

An immunohistochemical study of the distribution of the measles virus receptors, CD46 and SLAM, in normal human tissues and subacute sclerosing panencephalitis. *Lab Invest* **82**(4): 403-9.

Meierjohann, S. 1998.

Untersuchung des Tropismus verschiedener Masernvirus-Isolate, Diplomarbeit

Menezes, J., Leibold, W., Klein, G., and Clements, G. 1975.

Establishment and characterisation of an Epstein-Barr (EBV)-negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV-genome-negative african burkitt's lymphoma. *Biomedicine* **22**:276-284.

Mikhalap, S. V., L. M. Shlapatska, et al. 1999

CDw150 associates with src-homology 2-containing inositol phosphatase and modulates CD95-mediated apoptosis." *J Immunol* **162**(10): 5719-27.

Minagawa, H., K. Tanaka, et al. (2001)

Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes. *J Gen Virol* **82**(Pt 12): 2913-7. *MMWR.*, Jul. 199

Modrow, S., falke, F. 1997

Molekulare Virologie, Spektrum Lehrbuch

Moench, T. R., Griffin, D. E., Obriecht, C. R., Vaisberg, A. J., and Johnson, R. T. 1988.

Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA. *J. Infect. Dis.* **158**:433-442.

Momen H. 1998.

Emerging infectious diseases-Brazil. *Emerging Infectious Diseases* Vol 4 No. 1. www.cdc.gov/ncidod/EID/vol4no1/momen.htm

Morra, M., J. Lu, et al. 2001

Structural basis for the interaction of the free SH2 domain EAT-2 with SLAM receptors in hematopoietic cells. *Embo J* **20**(21): 5840-52.

Moss WJ, Cutts F, Griffin DE. 1999 Implications of human immunodeficiency virus epidemic for control and eradication of measles. *Clin. Inf. Dis* **29**(1):106-12

Murakami Y., T. Seya, M. Kurita, A. Fukui, S. Ueda, S. Nagasawa 1998.

Molecular cloning of membrane cofactor protein (MCP;CD46) on B95a cell, an Epstein-Barr virus-transformed marmoset B cell line: B95a-MCP is susceptible to infection by the CAM, but not the Nagahata strain of the measles virus. *Biochem. J.* **330**: 1351-1359.

Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T.F., Rossi, B., Roubardin-Combe, C., and Gerlier, D. 1993a.

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

Naniche, D., Wild, T. F., Roubardin-Combe, C., and Gerlier, D. 1992.

A monoclonal antibody recognizes a human cell surface glycoprotein involved in measles virus binding. *J. Gen. Virol.* **73**:2617-2624.

Naniche, D., Wild, T.F., Rabourdin-Combe, C., and Gerlier, D. 1993b

Measles virus haemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J. Gen. Virol.* 74: 1073-1079.

Nichols, K. E., D. P. Harkin, *et al.* 1998

Inactivating mutations in an SH2 domain-encoding gene in X-linked lymphoproliferative syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **95**(23): 13765-70.

Nichols, K. E., G. A. Koretzky, *et al.* 2001

SAP: natural inhibitor or grand SLAM of T cell activation?" *Nat Immunol* **2**(8): 665-6.

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

Absence of measles virus receptor (CD46) in lesions of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) brains. *Acta Neuropathol.* **94**:444-449.

Ogimoto, M., Y. Arimura, *et al.* 2001

Opposing regulation of B cell receptor-induced activation of mitogen- activated protein kinases by CD45. *FEBS Lett* **490**(1-2): 97-101.

Okada, N., Liszewski, M. K., Atkinson, J. P., and Caperon, M. 1995.

Membrane cofactor protein (CD46) is a keratinocyte receptor for the M protein of the group A streptococcus. *PNAS* 92:2489-2493.

Ono, M., S. Bolland, *et al.* 1996

Role of the inositol phosphatase SHIP in negative regulation of the immune system by the receptor Fc(gamma)RIIB." *Nature* **383**(6597): 263-6.

Ono, N., H. Tatsuo, *et al.* 2001

V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. *J Virol* **75**(4): 1594-600.

Osborne, M. A., G. Zenner, *et al.* 1996

The inositol 5'-phosphatase SHIP binds to immunoreceptor signaling motifs and responds to high affinity IgE receptor aggregation. *J Biol Chem* **271**(46): 9271-8.

Pinchouk, V. G., S. P. Sidorenko, *et al.* 1988 Monoclonal antibodies IPO-3 and IPO-10 against human B cell differentiation antigens. *Anticancer Res* **8**(6): 1377-80.

Pschyrembel , klinisches Wörterbuch 1997

De Gruyter, 258. Auflage, Version 1

Puck TT *et al.*, 1958 Genetics of somatic mammalian cells III. Long-term cultivation of euploid cells from human and animal subjects *J. Exp. Med.* 108: 945-956, 1958

Punnonen, J., B. G. Cocks, *et al.* 1997

Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes." *J Exp Med* **185**(6): 993-1004.

Rapp, F. 1964.

Plaque differentiation and replication of virulent and attenuated strains of measles virus. J. Bacteriol. 88:1448-1458.

Rima, B. K., J. A. Earle, et al. 1997

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

Rossmann., Y. He, et al. 2002

Picornavirus-receptor interactions. Trends Microbiol **10**(7): 324-31.

Rota J. S., Z. D. Wang, P. A. Rota, W. J. Bellini 1994.

Molecular epidemiology of measles virus. Seminars in Virology 6: 379-386.

Rota, J. S., Wang, Z.-D., Rota, P. A., and Bellini, W. J. 1994.

Comparison of sequences of the H, F, and N coding genes of measles virus vaccine strains. Vir. Res. 31:317-330.

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.

Santiago, C., E. Bjorling, et al. 2002

Distinct kinetics for binding of the CD46 and SLAM receptors to overlapping sites in the measles virus hemagglutinin protein. J Biol Chem **277**(35): 32294-301.

Santoro, F., P. E. Kennedy, et al. 1999

CD46 is a cellular receptor for human herpesvirus 6. Cell **99**(7): 817-27.

Schlender, J., J. J. Schnorr, et al. 1996

Interaction of measles virus glycoproteins with the surface of uninfected peripheral blood lymphocytes induces immunosuppression *in vitro*." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(23): 13194-9.

Schneider U et al., 1977

Characterization of EBV-genome negative "null" and "T" cell lines derived from children with acute lymphoblastic leukemia and leukemic transformed non-Hodgkin lymphoma Int. J. Cancer 19: 621-626, 1977

Schneider, Kailin, K., Billeter, M. 1997

Recombinant measles viruses defective for RNA editing and V protein synthesis are viable in culture cells Virology 20; 277(2):314-22

Schneider-Schaulies J. 1996b.

Identifizierung von zellulären Rezeptoren für Morbilliviren. Habilitationsschrift, Universität Würzburg.

Schneider-Schaulies, J., Dunster, L.M., Schwartz-Albiez, R., Krohne, G. und ter Meulen, V. 1995b.

Physical association of moesin and CD46 as a receptor complex for measles virus. J. Virol., 69, 2248-2256.

Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J.-J., Brinckmann, U., Dunster, L. M., Baczko, K., Liebert, U. G., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. 1995a.

Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains. PNAS USA. 92:3943-3947.

Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J.-J., Schlender, J., Dunster, L. M., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. 1996a

Receptor (CD46) Modulation and Complement-Mediated Lysis of Uninfected Cells after Contact with Measles Virus-Infected Cells. J. Virol. 70:255-263.

Schneider-Schaulies, S., Liebert, U.G., Baczko, K., and ter Meulen, V. 1990

Restricted expression of measles virus in primary rat astroglial cells. Virology 177:802-806.

Schnorr, J. J., M. Seufert, et al. 1997

Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression *in vitro*." J Gen Virol **78**(Pt 12): 3217-26.

Schonfeldt Vv, Krishnamurthy H, Foppiani L, Schlatt S. 1999

Magnetic cell sorting is a fast and effective method of enriching viable spermatogonia from djungarian hamster, mouse, and marmoset monkey testes. Biol Reprod ;61(3):582-9

Schoonbrodt, S., Piette, J. 1999

Successful transient transfection of T-lymphocytes using the FuGENE6 transfection reagent. Biochemica Newsletter 1

Seya, T., Hara, T., Matsumoto, M., Sugita, Y., and Akedo, H. 1990.

Complement-mediated tumor cell damage induced by antibodies against membrane cofactor protein (MCP, CD46). J. Exp. Med. 172:1673

Sidorenko, S. P. and E. A. Clark 1993

Characterization of a cell surface glycoprotein IPO-3, expressed on activated human B and T lymphocytes." J Immunol **151**(9): 4614-24.

Spear, P. G. 1993.

Entry of alphaherpesviruses into cells. Semin. Virol. 4:167

Stephens, P.E. und Cockett, M.J. 1989

The construction of a highly and versatile set of mammalian expression vektor. Nucleic acids Research 17(17):7110

Sundstrom C and Nilsson K

Establishment and characterization of a human histiocytic lymphoma cell line (**U-937**) Int. J. Cancer 17: 565-577, 1976

Tamin, A., Rota, P. A., Wang, Z. D., Heath, J. L., Anderson, L. J., and Bellini, W. J. 1994.
Antigenic analysis of current wild type and vaccine strains of measles virus. *J. Inf. Dis.* 170:795-801.

Tanaka, K., Xie, M., and Yanagi, Y. 1998

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

Tangye, S. G., J. H. Phillips, *et al.* 2000

The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin Immunol* **12**(2): 149-57.

Tangye, S. G. Phillips, J. H. Lanier, L. L.

The CD2-subset of the Ig superfamily of cell surface molecules: receptor-ligand pairs expressed by NK cells and other immune cells. *Semin Immunol*, Vol 12-2, 149-57

Taqi, A. M., M. B. Abdurrahman, *et al.* 1981

Regression of Hodgkin's disease after measles. *Lancet* **1**(8229): 1112.

Tatsuo, H. and Y. Yanagi 2002

The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol Immunol* **46**(3): 135-42.

Tatsuo, H., N. Ono, *et al.* (2000).

The cellular receptor for measles virus: SLAM (CDw 150) *Uirusu* **50**(2): 289-96.

Tatsuo, H., N. Ono, *et al.* 2000 SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus." *Nature* **406**(6798): 893-7

Ter Meulen, V., Stephanson, J.R. und Kreth, H.W. 1983.

Subacute sclerosing panencephalitis. Fraenkel-Conrath, H., Wagner, R.R., (eds). *Compr. Virol.* 18:105-159.

Tober, C., Seufert, M., Schneider, H., Billeter, MACS-Puffer., 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* 1998 72(10):8124-32

Vitek, CR., Aduddell, M., Briton M.J., Hoffmann, R.E. Redd, S.C., Jul. 1999 Increased protections during a measles outbreak of children previously vaccinated with second dose of measles-mumps-rubella vaccine. *Pediatr. Infect. Dis. J.*;18(7):620-3

Veillette A., 2002 The SAP family: A new class of adaptor-like molecules that regulates immune cell functions. *Science's stke*

Vlasak, R., Luytjes, W., Spaa, W., and Palese, P. 1988.

Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C virus. *PNAS.* 85:4526.

Wang, N., M. Morra, *et al.* 2001

CD150 is a member of a family of genes that encode glycoproteins on the surface of hematopoietic cells. *Immunogenetics* **53**(5): 382-94.

WHO, 1992.

World Health Organization Expanded Programme on Immunization. Measles Control in the 1990s: plan of action for global measles control. Geneva, WHO publication no. WHO/EPI/Gen/92.3.

WHO, 1999

Annex Table 2 Mortality by cause sex and WHO Region, estimates for 1998 World Health Report 1999

Wild, T.F., Malvoisin, E. und Buckland, R. 1991.

Measles virus: both the hemagglutinin and the fusion glycoproteins are required for fusion. *J. Gen. Virol.*, 72:439-442.

Xiao L., Scofield, MA., Jeffries, WB. 1998

Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding mouse alpha1a-adrenoceptor. *Br J Pharmacol* May;124(1):213-21

Yanagi, Y., N. Ono, *et al.* 2002

Measles virus receptor SLAM (CD150) *Virology* **299**(2): 155-61.

9 Abkürzungen

Abb.	Abbildung
MCS	multiple Klonierungsstelle (Multiple cloning site)
AK	Antikörper
Amp	Ampicillin
AS	Aminosäuren
BJABpEdm	persistierend mit Edm infizierte BJAB-Zellen
BJABpWtFb	persistierend mit WTFb infizierte BJAB-Zellen
bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum Albumin
CPE	zytopathischer Effekt
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dpi	Tage nach Infektion („days post infektion“)
Edm	Edmonston (MV-Vakzine)
ER	Endoplasmatisches Retikulum
F	Fusionsprotein des MV
FACS	fluorescence activated cell scanner; Durchflusszytometer
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat; Fluoreszenzfarbstoff
FKS	Fötales Kälberserum
FP	FACS-Puffer
g	Erdbeschleunigung
H	Hämagglutinationsprotein des MV
Std.	Stunde
HA	Hämagglutination

HIV	Humanes Immundefizienz Virus
Ig	Immunglobulin
kb	Kilobasen
kD	Kilodalton
LB	Nährmedium
μ	mikro
m	milli
M	Molar
MACS	magnetic cell sorting
mAK	monoklonaler Antikörper
MEM	minimal essential medium (Nährmedium)
MFI	mittlere Fluoreszenzintensität
MG	Molekulargewicht
min	Minuten
MOI	multiplicity of infection; infektiöse Dosis
mRNA	messenger-RNA (Boten-RNA)
MV	Masernvirus
MW	Molekulargewicht
n	nano
NA	Neuraminidase
PBL	Periphere Blutlymphozyten
PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
PFA	Paraformaldehyd
pfu	plaque forming unit
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
RNA	Ribonukleinsäure
RPMI	RPMI 1640 Zellkulturmedium
Rpm	round per minute (Umdrehungen pro Minute)
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde

SSPE	Subakute sklerotisierende Panenzephalitis
STP	Serin, Threonin, Prolinreiche Domäne des CD46
Tab.	Tabelle
TCID50	tissue culture infectious dose 50
U	Unit
UV	Ultraviolett
ÜN	über Nacht
UpM	Umdrehungen pro Minute
VSV	Vesicular Stomatitis Virus
WT	Wildtyp
WTFb	WildtypF, auf BJAB-Zellen passagiertes Wildtyp-Isolat
WTFv	WildtypF, auf Vero-Zellen adaptiertes Wildtyp-Isolat
ZNS	Zentrales Nervensystem

10 Lebenslauf

Hochschulausbildung

1999 - 2002

Promotion

Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius-Maximilians-Universität Würzburg
In der Arbeitsgruppe PD Dr. Jürgen Schneider-Schaulies

1996 - 1999

Hauptstudium

Julius - Maximilians - Universität Würzburg
Abschluß: Diplom
Note: Sehr gut

Diplomarbeit

Institut für Virologie und Immunbiologie der Julius - Maximilians-Universität Würzburg
In der Arbeitsgruppe PD Dr. Jürgen Schneider-Schaulies

Thema: „Durchsuchung einer eukaryontischen cDNA – Expressionsgenbank nach Rezeptoren für Masernviren“

1993 - 1996

Grundstudium

Justus - Liebig Universität in Giessen
Abschluß: Vordiplom

Zivildienst

1992 - 1993
Zivildienst im Rettungsdienst
des Deutschen Roten Kreuzes
in Castrop-Rauxel

1992 Jul.-Sept.
Ausbildung zum Rettungssanitäter

Schulische Ausbildung

1983 - 1992
Adalbert-Stifter **Gymnasium** in Castrop-Rauxel
Abschluß: Abitur

1979 – 1983
Grundschule in Castrop-Rauxel

11 Veröffentlichungen

11.1 Publikationen

Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus

Erlenhöfer C., Duprex P., Rima B.K., ter Meulen V., Schneider-Schaulies J.

J Gen. Virology 83: 4499 – 4505, 2002

New receptor that mediates measles virus infection identified and cloned

Erlenhoefer C.

Statagene Strategies Vol.14 No 4, Oktober 2001

CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition

Erlenhoefer C., Wurzer W.J., Löffler S., Schneider-Schaulies S., ter Meulen V., Schneider-Schaulies J.

J Virol. 75: 4499 – 4505, Mai 2001

11.2 Posterpräsentationen

Infection of endothelial cells with wildtype measles virus suggests the presence of an unknown cellular receptor

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2002, Erlangen

Oliver Andres, Karola Obojes, Christian Erlenhoefer, Jürgen Schneider-Schaulies

11.3 Vorträge

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie, Erlangen 2002

Receptor (CD46, CD150) usage by measles virus strains

XI. Measles-Meeting, Flein 2001

MV-CD150 (SLAM) interactions: receptor usage and downregulation

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie 2001, Dresden 2001

CD150 (SLAM) ist ein Rezeptor für Masernviren, aber nicht an der viralen kontaktvermittelten Proliferationsinhibition beteiligt

X. Measles-Meeting, Flein 2000

Identification of the MV wild-type receptor: CD150 (SLAM)

IX. Measles-Meeting, Flein 1999

Attempts to characterize a MV wild-type receptor

12 Danke !

Herrn PD Dr. Jürgen Schneider-Schaulies danke ich für das interessante Thema, für die gute wissenschaftliche Zusammenarbeit und das überaus freundliche Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. Georg Krohne danke ich für Bereitschaft diese Arbeit seitens der Fakultät für Biologie zu betreuen.

Herrn Prof. Dr. V. ter Meulen danke ich für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes am Institut für Virologie und Immunbiologie.

Sieglinde Löffler danke ich für den 5C6 Antikörper, ohne den diese Arbeit so nicht möglich gewesen wäre.

Ein besonderer Dank geht natürlich an meine Arbeitsgruppe mit Franziska Dimpfel, Kerstin Möller, Karola Obojes und Oliver Andres für die freundschaftliche Atmosphäre und Hilfe, sowie die vielen vielen Diskussionen.

Vielen Dank an meine Eltern Rosemarie und Günter, sowie meinen Bruder Michael für die moralische Unterstützung und Anteilnahme.

Ein großer Dank geht auch an meine Freunde, die ich nicht alle namentlich nennen kann, aber die einen wichtigen Ausgleich zum Laboralltag darstellten.

Nicht zuletzt danke ich Frauke, durch deren Aufmunterung die letzten Monate so viel leichter waren.