



Analyse der Speziesbarriere humaner Zellen gegenüber Infektion mit Hundestaupevirus (CDV)

Analysis of the species barrier of human cells against infection with canine distemper virus (CDV)

Dissertation zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences,
Julius-Maximilians-Universität Würzburg,

Klasse Immunmodulation

Vorgelegt von

Maria Bieringer

aus

Simbach am Inn

Würzburg 2014

Eingereicht am:

Bürostempel

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender: Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer: Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies

2. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Dandekar

3. Betreuer: Prof. Dr. Thomas Herrmann

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Analyse der Speziesbarriere humaner Zellen gegenüber Infektion mit Hundestaupevirus (CDV)“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberaters angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen und Hilfsmittel verwendet zu haben.

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

Ort, Datum

Unterschrift

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled „Analysis of the species barrier of human cells against infection with canine distemper virus (CDV)“ is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

Place, Date

Signature

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis	VI
Zusammenfassung	VII
Summary.....	VIII
1. Einleitung.....	1
1.1. Die Morbilliviren.....	1
1.1.1. Der Genus Morbillivirus.....	1
1.1.2. Biologie und Aufbau der Morbilliviren.....	2
1.1.3. Das Genom der Morbilliviren.....	2
1.1.4. Die Proteine der Morbilliviren	3
1.1.4.1. Das Nukleokapsidprotein	3
1.1.4.2. Das Phosphoprotein.....	4
1.1.4.3. Das Matrixprotein	5
1.1.4.4. Das Fusionsprotein	5
1.1.4.5. Das Hämagglutinin.....	6
1.1.4.6. Die Polymerase.....	7
1.1.5. Der Infektions- und Replikationszyklus	7
1.1.6. Das Hundestaupevirus (CDV)	9
1.2. Die Pathogenese und Erkrankung.....	9
1.3. Die Eliminierung des Masernvirus.....	10
1.4. Die zellulären Rezeptoren	11
1.4.1. Das Signaling Lymphocyte Activating Molecule (SLAM; CD150).....	11
1.4.2. Das Nectin4	13
1.5. Vorarbeiten zu dieser Arbeit.....	14
1.6. Zielsetzung der Arbeit	18
2. Material.....	19
2.1. Reagenzien	19
2.2. Puffer und Lösungen	20
2.3. Geräte	20
2.4. Primer.....	21
2.5. Enzyme	21
2.6. Kitsysteme.....	22
2.7. Antikörper.....	22
2.8. Zellen	22
2.9. Bakterien	22
2.10. Medien	23
2.11. Antibiotika.....	23
2.12. Plasmide	23

2.13. Verbrauchsmaterial	23
2.14. Viren.....	24
2.15. Software	24
3. Methoden.....	25
3.1. Zellbiologische Methoden.....	25
3.1.1. Kultivierung von Zellen.....	25
3.1.2. Zellen einfrieren und auftauen	25
3.1.3. Passagierung von Zellen.....	25
3.1.4. Zellzahlbestimmung	25
3.2. Virologische Methoden.....	26
3.2.1. Viruszucht und Passagierung	26
3.2.2. Wachstumskurven von Virusinfektionen	26
3.2.2.1. Virusvermehrung auf adhärennten Zellen	26
3.2.2.2. Virusvermehrung auf Suspensionszellen	26
3.2.3. Virusinfektion für RNA-Isolation	27
3.2.4. Viruspräparation.....	27
3.2.5. Plaqueaufreinigung von Viruspartikeln.....	27
3.2.6. Bestimmung des Virustiter	28
3.2.6.1. Virustiterbestimmung mittels Plaque-Test.....	28
3.2.6.2. Virustiterbestimmung von lentiviralen Partikeln.....	28
3.2.7. Herstellung von pseudotypisierten, lentiviralen Partikeln	28
3.2.8. Einengen lentiviraler Partikel.....	29
3.3. Molekularbiologische Methoden.....	30
3.3.1. Agarose-Gelelektrophorese.....	30
3.3.2. RNA-Isolation.....	30
3.3.2.1. TRIzol (Invitrogen).....	30
3.3.2.2. PegGold RNAPure (peqlab)	31
3.3.3. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung	31
3.3.4. Reverse Transkription.....	31
3.3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	32
3.3.5.1. PCR-Ansatz mit PuRe-Taq-Ready-To-Go-PCR-Beads	32
3.3.5.2. PCR-Ansatz mit <i>Taq-DNA-Polymerase</i>	32
3.3.5.3. PCR mit <i>Phusion-Polymerase</i>	33
3.3.6. Restriktionsendonuklease Verdau	33
3.3.7. <i>Klenow</i> -Fragment	34
3.3.8. DNA-Dephosphorylierung.....	34
3.3.9. Ligation	35
3.3.10. Mykoplasmentest	35
3.3.11. Sequenzierung.....	35
3.3.12. DNA-Gelextraktion	36
3.4. Mikrobiologische Methoden.....	36
3.4.1. Herstellung thermokompetenter Bakterien	36
3.4.2. Transformation thermokompetenter Bakterien	36

3.4.3. Vor- und Hauptkultur von Bakterien.....	37
3.4.4. Plasmidpräparation.....	37
3.4.4.1. Minipräparation	37
3.4.4.2. Maxipräparation	37
3.4.5. Glycerinkultur.....	37
3.5. Immunhistochemische Methoden.....	38
3.5.1. Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie	38
3.5.1.1. Durchflusszytometrie.....	38
3.5.1.2. Zellsortierung	38
3.5.1.3. Bestimmung der zellulären Proliferationsrate.....	39
3.5.2. Immunfluoreszenzfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie	39
3.5.3. Antikörperspezifische Hemmung von Rezeptorepitopen	39
3.6. Software und Auswertungsprogramme	40
3.6.1. Primerdesign	40
3.6.2. Sequenzierung.....	40
3.6.3. Plasmidkarten.....	40
3.6.4. Photobearbeitung	40
3.6.5. Strukturmodelle.....	40
3.6.6. Auswertungen mit Tabellen und Graphen	40
4. Ergebnisse.....	41
4.1. Adaptierung von rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red an humanes Nectin4.....	41
4.1.1. Oberflächenexpression von Nectin4 auf H358-Zellen.....	41
4.1.2. Hemmung der CDV-Infektion von H358-Zellen mit humanen Nectin4 Antikörper	43
4.1.3. Sequenzanalyse des CDV-H358	44
4.1.4. Herstellung von Nectin4-exprimierenden Vero-Zelllinien	47
4.1.5. Virusvermehrung von CDV-A75/17red und MV-IC323eGFP auf cN4- und hN4-exprimierenden Vero-Zelllinien	52
4.2. Adaptierung von rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red an humanes SLAM (CD150).....	54
4.2.1. Adaptierung von CDV-A75/17red an Vero-hSLAM Zellen	54
4.2.2. Virusvermehrung auf SLAM-exprimierenden Zellen	58
4.2.3. Hemmung der CDV-A75/17red-Infektion von SLAM-exprimierenden Zellen mit hSLAM-Antikörper.....	60
4.2.4. Isolierung einzelner Synzytien und Herstellung von Virusklonen.....	61
4.2.5. Sequenzierung des CDV-hSLAM	62
4.2.6. Modellanalyse der Interaktion des Hämagglutinin mit dem humanen SLAM (CD150)	63
4.3. Virusvermehrung von CDV-A75/17red, CDV-hSLAM und MV-IC323eGFP auf humanen B-Lymphozyten Zelllinien.....	65

5. Diskussion	68
5.1. Adaptierung von rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red an humanes Nectin4.....	68
5.1.1. Verwendung des Nectin4 als Virusrezeptor.....	68
5.1.2. Anpassung des CDV-A75/17red an die H358-Zelllinie auf Genomebene.....	69
5.1.3. Speziesunabhängige Nectin4 Verwendung von CDV- A75/17red und MV-IC323eGFP.....	71
5.2. Adaptierung von wildtypischem, rekombinantem CDV-A75/17red an das humane SLAM.....	73
5.2.1. Effiziente Adaptierung von CDV-A75/17red an Vero-hSLAM-Zellen .	73
5.2.2. Speziesunabhängige SLAM Verwendung von CDV-hSLAM	74
5.2.3. Verwendung von humanen SLAM als Virusrezeptor	74
5.2.4. Anpassung des CDV-A75/17red an Vero-hSLAM auf Genomebene.	75
5.2.5. Interaktion des Hämagglutinin mit dem humanen SLAM	77
5.3. Vergleich der MV- und CDV-Infektion von humanen B-Lymphozyten Zelllinien.....	78
6. Anhang	80
6.1. Amplifikations- und Sequenzierungsprotokoll der Genomsequenzierung	80
6.2. PCR-Kontrolle des Plasmides pF6gW-hN4.....	83
7. Verzeichnisse	84
7.1. Abbildungsverzeichnis.....	84
7.2. Tabellenverzeichnis.....	85
7.3. Literaturverzeichnis	86
8. Danksagung	97
9. Lebenslauf	98
10. Veröffentlichungen.....	99
10.1. Publikationen	99
10.2. Präsentationen.....	99
10.2.1. Vorträge	99
10.2.2. Poster.....	99

Abkürzungsverzeichnis

A	Adenin
A/Ala	Alanin
ATV	Antibiotic Trypsin Versene
B	Base
bp	Basenpaar
BSA	Bovines Serum Albumin
C	Cytosin
C/Cys	Cystein
cDNA	Komplementäre DNA
CDV	Canine Distemper Virus
CFSE	Carboxyfluorescein Diacetat N-Hydroxysuccinimidyl Ester
CIAP	Calf Intestine Alkaline Phosphatase
D/Asp	Asparaginsäure
DC- SIGN	C-type lectin DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMV	Dolphine Morbillivirus
DNA	Desoxynukleinsäure
dNTP	Desoxynukleotidtriphosphat
dpi	Tage nach Infektion
E/Glu	Glutaminsäure
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
eEGFP	Enhanced Green Fluoreszenz Protein
F	Fusion
F/Phe	Phenylalanin
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorting
FCS	Fetales Kälber Serum
FSC	Forward Scatter
g	Gramm
g	Erdbescheulungung
G	Guanosin
G/Gly	Glycin
H	Stunde
H	Hämagglutinin
H/His	Histidin
HIV	Humanes Immundefizienz Virus
HPLC	High Performance Liquid Chromatography
I/Ile	Isoleucin
Ig	Immunglobulin

K/Lys	Lysin
kb	Kilobase
kDa	Kilo Dalton
M	Meter
MEM	Minimal Essential Medium
min	Minute
MLV	Murines Leukemia Virus
MOI	Multiplicity Of Infection
MV	Masernvirus
nt	Nukleotid
PBS	Phosphat gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDV	Phocine Distemper Virus
PEI	Polyethylenimin
PFA	Paraformaldehyd
Pfu	Plaque Forming Units
PMV	Morbillivirus der Wale
PPRV	Peste des petits Ruminants Virus
Q/GIN	Glutamin
R/Arg	Arginin
RNA	Ribonukleinsäure
Rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI 1640	Medium; Roswell Park Memorial Institute
RPV	Rinderpestvirus
RSV	Rous Sarcoma Virus
S/Ser	Serin
sek	Sekunde
T	Thymidin
T/Thr	Threonin
Tris	Tris(hydroxymethyl)- aminomethan
UTR	untranslatierteRegion
V/Val	Valin
VSV-G	Vesicular Stomatitis Virus G Protein
W/Trp	Tryptophan
WHO	Weltgesundheitsorganisation
Y/Tyr	Tyrosin

Zusammenfassung

Die geplante Ausrottung der Masern bis 2020 und die damit eventuell einhergehende Beendigung der Masernimpfung könnten die Voraussetzungen dafür schaffen, dass andere Morbilliviren, wie beispielsweise das Hundestaupevirus (CDV), einen Wirtswechsel zum Menschen vollbringen könnten. CDV ist ein hoch ansteckendes Pathogen und besitzt einen weiten Wirtstropismus, der sich aktuell immer weiter ausbreitet. Im Gegensatz dazu kann das Masernvirus (MV) nahezu ausschließlich Menschen und nur sehr bedingt wenige Affenarten infizieren.

In dieser Doktorarbeit konnte gezeigt werden, dass eine Adaptierung des rekombinanten wildtypischen CDV-Stammes CDV-75/17red an den humanen Rezeptor SLAM (signaling lymphocytic activation molecule, CD150) reproduzierbar und innerhalb weniger Passagen erfolgt. Bei der Adaptierung an das humane SLAM ist dabei nur eine Mutation in dem Gen für das virale Hämagglutinin notwendig. Diese Mutation an Position 8697 von A zu G im viralen Genom (Aminosäure D540G im Hämagglutinin) konnte reproduzierbar detektiert werden, obwohl veröffentlicht wurde, dass unterschiedliche Mutationen im Hämagglutinin verschiedener CDV-Stämme eine SLAM-Adaptierung ermöglichen. Die Mutation D540G im Hämagglutinin des humanen SLAM-adaptierten CDV-A75/17red kompensiert eine negative Ladung der Aminosäure 71E, die speziesspezifisch im humanen SLAM vorhanden ist. Durch Wachstumskinetiken konnte belegt werden, dass das an humanes SLAM-adaptierte CDV-A75/17red auch weiterhin das canine SLAM effizient verwendet. Ein weiterer Eintrittsrezeptor, humanes Nectin4, konnte mit demselben CDV-Stamm ohne adaptive Mutation in den viralen Hüllproteingenen benutzt werden.

Wachstumskurven auf verschiedenen humanen B-Lymphozyten Zelllinien zeigen allerdings, dass eine alleinige Adaptierung an die humanen Wirtszellrezeptoren, für eine effiziente Virusreplikation, nicht ausreicht. Damit das CDV die Speziesbarriere durchbrechen kann, muss offenbar ein weiterer Adaptierungsprozess an die humanen Wirtszellen erfolgen, der voraussichtlich mit umfangreicheren Mutationen des viralen Genoms einhergehen würde.

Diese Ergebnisse unterstreichen, dass intrinsische Faktoren und das angeborene Immunsystem eine wichtige Barriere bilden und den Menschen vor einer CDV-Infektion schützen. Allerdings würde eine Fortführung der MV-Impfung auch nach Ausrottung der Masern, aufgrund der Kreuzreaktivität gegen andere Morbilliviren, den Schutz vor einer möglichen Adaptierung eines Morbillivirus, wie CDV, an den Menschen deutlich verstärken.

Summary

The planned eradication of measles in 2020 and the possible consequential termination of MV-vaccination could eventually generate the condition for other morbilliviruses, such as the canine distemper virus (CDV), to adapt to the human host. CDV is a highly contagious pathogen with a broad host range, which is currently even increasing. In contrast to this, measles virus (MV) is restricted to the human host with the exception of infections of few monkey species.

In this doctoral thesis it could be demonstrated that adaptation of the recombinant wild-type CDV strain CDV-A75/17red to the human receptor SLAM (signaling lymphocytic activation molecule, CD150) occurs reproducibly in only few passages. Only one mutation in the gene for the viral hemagglutinin is needed for the adaptation to human SLAM. This mutation at position 8697 from A to G in the viral genome (amino acid D540G in the hemagglutinin) was detected reproducibly, although it has been published that different mutations in the hemagglutinin gene of various CDV strains may allow the adaptation to human SLAM. The mutation D540G of the human SLAM adapted CDV-A75/17red compensates for the species specific negative charge of amino acid 71E in human SLAM. Furthermore it was illustrated by growth curves, that the human SLAM adapted CDV-75/17red can still use both, the human and the canine SLAM, receptors. Another entry receptor, human nectin4, could be utilized by CDV-A75/17red without any adaptive mutation in the viral surface protein genes.

Growth kinetics on different human B-lymphocytic cell lines confirmed, however, that adaptation to the human host cell receptors is not sufficient to enable efficient viral replication in human cells. In order to cross the species barrier, further adaptive processes are required for CDV, which will probably be associated with multiple mutations in the viral genome.

The results underline, that intrinsic factors and the innate immune system constitute an important barrier and protect humans from a CDV-infection. Due to the cross reactivity with other morbilliviruses, a sustained MV-vaccination after the eradication of measles could clearly improve the protection of humans against the potential adaptation of a morbillivirus like CDV.

1. Einleitung

1.1. Die Morbilliviren

1.1.1. Der Genus Morbillivirus

Die Gattung der Mononegavirales wird untergliedert in die Familie der Bornaviridae, Filoviridae, Rhabdoviridae und der Paramyxoviridae. Die Familie der Paramyxoviridae besteht aus zwei Unterfamilien, der Pneumovirinae und der Paramyxovirinae. Zu dieser Unterfamilie der Paramyxovirinae gehören die Avulaviren, Ferlaviren, Henipaviren, Respiroviren, Rubulaviren, Aquaparamyxoviren und die Morbilliviren (NCBI Taxonomy Browser). Sie besitzen ein nichtsegmentiertes, einzelsträngiges Genom in Negativstrangorientierung und können sowohl Menschen als auch verschiedenste Tierarten infizieren. Zum Genus der Morbilliviren gehören das Masernvirus (MV), das Hundestaupavirus (Canine-Distemper-Virus, CDV), das Seehundestaupavirus (Phocine-Distemper-Virus, PDV), das Rinderpestvirus (RPV), das Staupavirus der kleinen Huftiere (Peste-des-petits-Ruminants-Virus, PPRV), das Morbillivirus der Delphine (DMV) und das Morbillivirus der Tümmler (Porpoise-Morbillivirus, PMV, Abb. 1). Das MV ist hierbei der einzige humanpathogene Vertreter der Morbilliviren. Experimentell können jedoch auch Rhesus Makaken mit MV infiziert werden (Swart 2009, Vries et al. 2012). Das CDV besitzt einen breiten Wirtstropismus und kann neben den typischen Karnivoren auch andere Tierarten infizieren. So wurden CDV-Infektionen unter anderem auch in Löwen, Leoparden, Tiger, Baikalrobben und einigen Affenarten nachgewiesen (Yoshikawa et al. 1989, Visser et al. 1993, Appel et al. 1994, Roelke-Parker et al. 1996, Qiu 2011, Sakai et al. 2012). In Zellkulturexperimenten wurde auch die Infektion von Hamsterzelllinien und B85a-Zellen (lymphoblastoide Zelllinie aus dem Krallenaffen) gezeigt (Seki et al. 2003, Sultan et al. 2009). Das CDV besitzt, wie das MV, nur einen Serotyp, welcher jedoch in verschiedene Gruppen, anhand des geographischen Erscheinens, unterteilt ist. So gibt es für CDV, neben dem Impfstamm, den nordamerikanischen, europäischen, afrikanischen, asiatischen und den arktischen Stamm (McCarthy et al. 2007, Kapil et al. 2008).

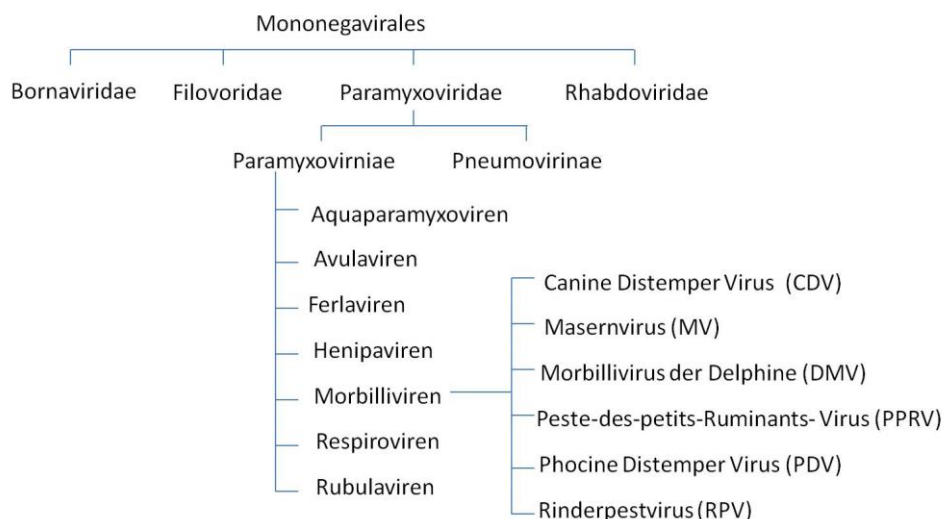


Abbildung 1: Taxonomie der Morbilliviren (NCBI Taxonomy Browser)

1.1.2. Biologie und Aufbau der Morbilliviren

Die Morbilliviren bestehen aus einem sphärischen, infektiösen Viruspartikel mit einer Größe von 100 – 200 nm. Dieses Viruspartikel besteht aus einer zellulären Hüllmembran mit den viralen Oberflächenproteinen. Das Hämagglutinin (H) und das Fusionsprotein (F) befinden sich an der Oberfläche des Viruspartikels, um die Virusbindung und die Virusaufnahme in eine Wirtszelle zu ermöglichen (Abb. 2). Im Inneren des Viruspartikels ist das einzelsträngige, nichtsegmentierte Genom in Negativstrangorientierung in einer linksgängigen Helix von 14 – 17 nm Durchmesser vorhanden (Abb. 2). Das Genom der Morbilliviren wird von dem Nukleokapsidprotein (N), im Abstand von jeweils sechs Nukleotiden, verpackt und damit stabilisiert. Für die Replikation und Transkription bilden das N-Protein, das Phosphoprotein (P) und das L-Protein den Komplex der RNA-abhängigen-RNA-Polymerase und ermöglichen dadurch das Ablesen und die Vervielfältigung des Genoms. Des Weiteren befindet sich noch ein Matrixprotein (M) im Inneren des Viruspartikels. Dieses Protein verbindet das verpackte Genom mit der Hüllmembran, wird jedoch nicht an der Oberfläche des Virus exponiert.

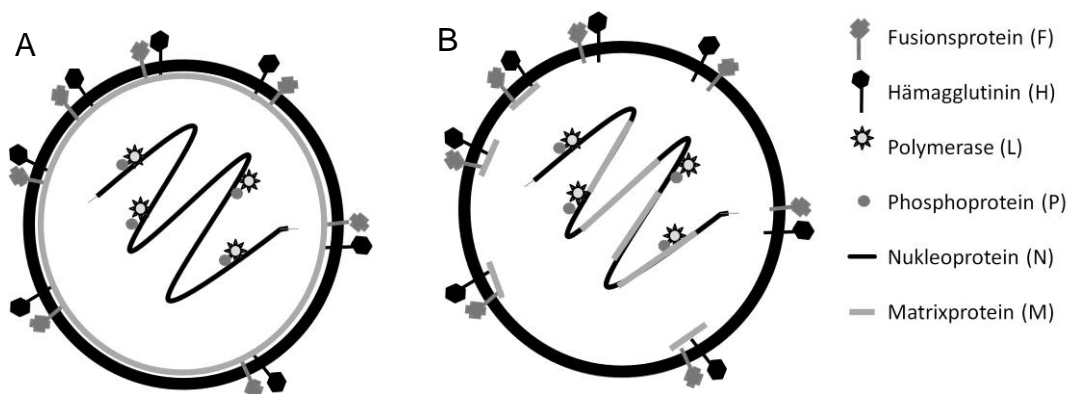


Abbildung 2: Übersicht eines Morbilliviruspartikels (modifizierte Abbildung nach Vries 2013)

Das sphärische Viruspartikel besitzt ein nichtsegmentiertes, einzelsträngiges Genom in Negativstrangorientierung. An der Oberfläche befinden sich die Hüllproteine H und F, die in die Membran integriert sind. Das M-Protein bindet zum einen an die Innenseite der Zellmembran (A) zum anderen belegen neuere Studien sowohl eine Interaktion mit den Glykoproteinen als auch mit dem Ribonukleoproteinkomplex (B, Liljeroos et al. 2011). Das N-Protein ummantelt die virale RNA und der Ribonukleoproteinkomplex, aus N-, P- und L-Protein ist an das Genom gebunden.

1.1.3. Das Genom der Morbilliviren

Die Morbilliviren haben ein einzelsträngiges, nichtsegmentiertes Genom in Negativstrangorientierung (ss (-) RNA, Abb. 3). Das Genom des MV hat eine Länge von 15892 Nukleotiden (nt) und das Genom des CDV ist 15690 nt lang. Das Genom alleine ist nicht infektiös. Es beinhaltet die sechs Gene in der Reihenfolge 3` N-P-M-F-H-L 5` und kodiert für acht Proteine (Abb. 3). Diese viralen Gene beinhalten sowohl eine 3`- als auch eine 5`-untranslatierte Region (UTR). Zwischen den einzelnen Genen befindet sich eine kurze Nukleotidsequenz, die intergenische Region (IGS). Am 3´-Ende befindet sich eine Leader-Sequenz von 52 – 54 nt, die aber für kein Protein kodiert. Diese Leader-Sequenz ermöglicht die Bindung des

Ribonukleoproteinkomplexes (RNP-Komplex) an das Genom und ist somit Startpunkt für die Replikation und Transkription des viralen Genoms. Am 5`-Ende des Genoms befindet sich der Trailer. Dieses Fragment ist 40 - 44 nt lang, wird nicht transkribiert und enthält ein cis-aktives Initiationssignal für den Polymerasestart und zur Verpackung in das Viruspartikel. Obwohl die Genomlänge unterschiedlicher CDV-Stämme gleich ist, unterscheiden sich die Sequenzen bis zu 10%. Hierbei sind vor allem das H-Gen und die Region zwischen dem M- und F-Gen betroffen. Die Proteine N, P, M und L hingegen sind besser konserviert (Bellini et al. 1986, Martella et al. 2006, Anderson und Messling 2008).

Für experimentelle Infektionen werden rekombinante Viren verwendet, die ein zusätzliches Fluoreszenzgen im viralen Genom haben. Das wildtypische, rekombinante CDV-A75/17red besitzt ein tdTomato-Gen zwischen dem M- und dem F-Gen (Abb. 3, Plattet et al. 2004). Das rekombinante MV-IC323eGFP stammt von dem wildtypischen IC (Ichinose)-B Stamm von MV ab und exprimiert das Grünfluoreszierende Protein (eGFP). Diese eGFP-Sequenz befindet sich zwischen der Leader-Sequenz und dem N-Gen (Hashimoto et al. 2002). Bei der Herstellung rekombinanter Morbilliviren muss, aufgrund der Interaktion mit dem N-Protein, die „rule of six“ beachtet werden, d.h. die Genomlänge (Anzahl der Nukleotide) ist optimalerweise ein Vielfaches von sechs.

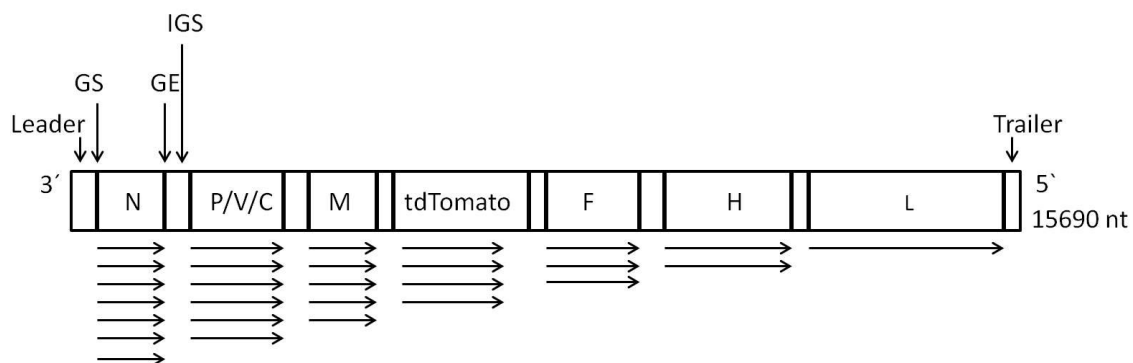


Abbildung 3: Genomstruktur des rekombinanten, wildtypischen CDV-A75/17red

Das rekombinante, wildtypische CDV-A75/17red hat sechs virale Gene (3` N-P-M-F-H-L 5`) und ein tdTomato-Rot kodierendes Gen zwischen dem M- und dem F-Gen. Jedes Gen wird von einer Genstartsequenz (GS) und einer Genendsequenz (GE) begrenzt. Zwischen den Genen befinden sich intergenische Sequenzen (IGS). Zusätzlich befindet sich am 3`-Ende eine Leader-Sequenz und am 5`-Ende eine Trailer-Sequenz. Die Pfeile unterhalb des Genoms symbolisieren die relative Häufigkeit der transkribierten, monocistronischen mRNAs.

1.1.4. Die Proteine der Morbilliviren

1.1.4.1. Das Nukleokapsidprotein

Das Nukleokapsidgen (N) ist am 3`-Ende des Genoms lokalisiert und wird als erstes Gen transkribiert. Aufgrund des Transkriptionsgradienten wird dieses Gen am meisten transkribiert (Abb. 3). Das N-Protein bindet mit seiner aminoterminalen Sequenz, in einem Abstand von sechs Nucleotiden, an das Genom und verhindert dadurch die Degradierung des viralen Genoms durch Nucleasen. Auf diese Weise

trägt es zur Stabilisierung und Flexibilität des viralen Genoms bei. Durch eine weitere Interaktion mit dem M-Protein wird die richtige Faltung und Verpackung des viralen Genoms in das Viruspartikel gewährleistet. Des Weiteren bindet dieses Protein mit seinem carboxyterminalen Bereich auch an den RNP-Komplex und interagiert dadurch mit dem P- und L-Protein. Dieser Gesamtkomplex ist dann für die Replikation und Transkription des Genoms verantwortlich. Das N-Gen des CDV hat eine Nukleotidlänge von 1682 nt und kodiert für ein 523 Aminosäure (aa) langes Protein mit einem Molekulargewicht von 58 kDa (Masuda et al. 2006). Ein Vergleich zwischen dem wildtypischen N-Gen von CDV und dem Impfstamm zeigt eine Sequenzidentität von 95% auf (Stettler und Zurbriggen 1995). Neue asiatische Virusisolate, welche eine geringere Homologie besitzen, sind jedoch immer noch antigenetisch identisch zum Impfstamm (Yoshida et al. 1998).

1.1.4.2. Das Phosphoprotein

Das Phosphogen (P) des MV und CDV kodiert für das P-Protein, für das C-Protein durch ein zweites Translationsstartkodon (ATG, 1823 nt im Genom) mit eigenem Leseraster (+1 im Vergleich zu P) und für das V-Protein durch eine Editierung von Guanosin (2491 nt im Genom) der P-mRNA und nachfolgender Leserasterverschiebung (-1). Die P- und V-Proteine unterscheiden sich damit in ihrem carboxyterminalen Bereich, während das C-Protein ein anderes Leseraster hat. Beim CDV ist das P-Gen 1654 nt lang und kodiert für ein 507 aa langes Protein mit einem Molekulargewicht von 54 kDa. Das V-Gen kodiert für ein Protein der Länge 299 aa und einem Molekulargewicht von 33 kDa. Das C-Protein besteht aus 174 aa und hat ein Molekulargewicht von 20 kDa. Das P-Protein ist aufgrund der Interaktion mit dem RNP-Komplex wichtig für die Replikation und Transkription des Genoms. Dabei bindet der carboxyterminale Bereich an das L-Protein und der aminoternale Bereich interagiert mit dem freien monomerischen N-Protein (Sugai et al. 2009). Das C-Protein spielt eine Rolle in der Aktivierung der viralen Polymerase und interferiert mit Signalwegen der angeborenen Immunantwort infizierter Zellen (Röthlisberger et al. 2010). Es ist auch für den Viruszusammenbau und dessen Freisetzung nötig, wodurch es die Virulenz verstärkt (Devaux und Cattaneo 2004, Messling et al. 2006). Das V-Protein spielt eine bedeutende Rolle bei der Hemmung der Immunabwehr in infizierten Wirtszellen. Bei einer Infektion hemmt dieses Protein durch die Bindung an *Janus-Kinase-1* (JAK), „Melanoma Differentiation-Associated-Protein-5“ (mda-5), „Signal-Transducers and Activators of Transcription-1“ (STAT) und STAT2 unter anderem den Interferon-1 Signalweg der Zelle (Rima und Duprex 2011, Devaux et al. 2013).

1.1.4.3. Das Matrixprotein

Das Matrixprotein (M) ist ein wichtiges Bindeglied zwischen dem RNP-Komplex und der Hüllmembran des Virus. Dadurch sorgt dieses Protein für die Assemblierung und Freisetzung des Viruspartikels aus der Zelle (Bellini et al. 1986). Ebenso wird durch die Bindung des M-Proteins an den RNP-Komplex die virale Polymeraseaktivität reduziert (Suryanarayana et al. 1994, Reuter et al. 2006, Zinke et al. 2009). Das M-Protein befindet sich an der Innenseite des Viruspartikels und kann dadurch auch mit dem zytoplasmatischen Bereich des F-Proteins interagieren (Riedl et al. 2002, Wiener et al. 2007, Runkler et al. 2007). So führt eine Deletion des MV-M-Proteins zu einer eingeschränkten Virusfreisetzung (Cathomen et al. 1998). Aktuelle elektronenmikroskopische Aufnahmen zeigen jedoch eine verstärkte Interaktion des M-Proteins mit der an N-gebundenen viralen RNA (Liljeroos et al. 2011). Das M-Gen des CDV kodiert für 335 aa und besitzt ein Molekulargewicht von 38 kDa.

1.1.4.4. Das Fusionsprotein

Das Fusionsprotein (F) ist ein glykosyliertes, Typ-I Transmembranprotein mit einer Länge von 662 aa. Es besteht aus einem aminoterminalen Bereich mit zwei Wiederholungssequenzen mit sieben Aminosäuren langen Einheiten (heptad repeat; HR-A, HR-B) und dem hydrophoben Fusionspeptid (FP), einer Transmembrandomäne, sowie einem carboxyterminalen, zytoplasmatischen Bereich (Abb. 4, Messling et al. 2004b). Im endoplasmatischen Retikulum (ER) erfolgen die Trimerbildung des F-Proteins und der Einbau der Transmembrandomäne. Das F₀-Vorläuferprotein wird durch eine Furinprotease in die metastabilen Prefusionsformen F₁ und F₂ proteolytisch gespalten, welche über Disulfidbrücken eine Heterodimerstruktur bilden (Abb. 4, Messling et al. 2004b). Hierbei ist der F₁-Proteinanteil der Zellmembran zugewandt und im Viruspartikel verankert. In diesem F₁-Protein befindet sich auch das FP, welches bei der Fusion in die Zellmembran inseriert wird (Baker et al. 1999). Der F₂-Proteinanteil ist von der Zellmembran abgewandt. Die proteolytische Aktivierung des F-Proteins im Trans-Golgi-Kompartiment ist nötig, um die volle Funktionalität des Proteins und dessen Fusion mit der Zellmembran zu erreichen. Nur im Komplex mit dem H-Protein kommt es nach Bindung an einen zellulären Rezeptor zu einer exzessiven und irreversiblen Konformationsänderung, welche dann die Fusion mit der Zellmembran induziert.

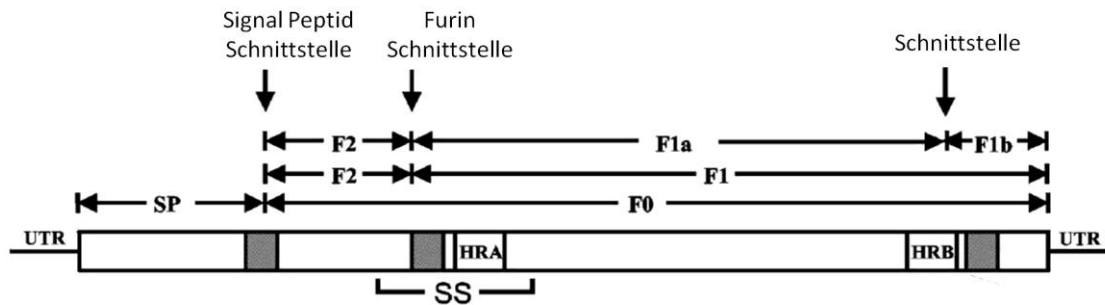


Abbildung 4: Aufbau und Struktur des Fusionsprotein (modifizierte Abbildung nach Messling et al. 2004b)

Das F-Protein enthält ein Signalpeptid (SP) und einen F₀-Abschnitt. Im carboxyterminalen Bereich befinden sich zwei Wiederholungen (HR-A und B). Die Furinprotease spaltet das F-Protein in die metastabilen Formen F₁ und F₂, die über Disulfidbrücken verbunden sind (SS). Zusätzlich kann das F₁-Protein in die Abschnitte F_{1a} und F_{1b} gespalten werden (UTR: untranslatierte Region).

1.1.4.5. Das Hämagglutinin

Das Hämagglutinin (H) der Morbilliviren kodiert für das Typ-II integrale Transmembranprotein, das die Interaktion des Virus mit dem Wirtszellrezeptor ermöglicht. Dieses Glykoprotein ist für die Virusaufnahme in spezifische Wirtszellen von Bedeutung und spielt eine wichtige Rolle in der Pathogenese. Im Gegensatz zu anderen Paramyxoviren besitzt das H-Protein der Morbilliviren keine Neuroaminidaseaktivität. Außerdem enthält es mehrere konservierte N-Glykosylierungsstellen von denen nicht alle in Verwendung sind (Sawatsky und Messling 2010). Eine Deletion aller N-Glykosylierungsstellen des CDV-H_{5804P} wird vom Virus toleriert und führt zu keinem Funktionsverlust, resultiert aber in einer verminderten Virusexpression (Sawatsky und Messling 2010). Das CDV-H-Protein besteht aus 607 aa und hat eine Nukleotidlänge von 1945 nt. Das H-Protein enthält einen kurzen aminoterminalen, zytoplasmatischen Bereich, eine Transmembrandomäne und eine lange, carboxyterminale Ektodomäne (Abb. 5a, Navaratnarajah et al. 2011). Dieser Bereich gliedert sich in eine kurze Stielregion, welche α -helikal gedreht ist, und in einen globulären Kopfbereich (Abb. 5c, Navaratnarajah et al. 2011). Diese kubisch geformte β -Propellerstruktur besteht aus sechs β -Faltblättern, dient der Rezeptorerkennung und wird vom Immunsystem als Antigen erkannt (Abb. 5b Langedijk et al. 1997). Vor allem der Bereich β 4, β 5 und β 6 ist für die Bindung an die zellulären Rezeptoren CD150 (Signaling Lymphocyte activating molecule, SLAM) und Nectin4 wichtig (siehe 1.4., Hashiguchi et al. 2007, Hashiguchi et al. 2011a). Besonders in der β 5-Region des CDV-H-Proteins existieren zwei Bereiche, welche für die Bindung an SLAM von Bedeutung sind (Messling et al. 2005, Zipperle et al. 2010). Diese Bereiche liegen eng beieinander, haben jedoch keinen direkten Kontakt zueinander (Messling et al. 2005). An der Virusoberfläche wird dieses H-Protein als Disulfid-gebundenes Homodimer exponiert, welches sich dann über nichtkovalente Bindungen zu einem Tetramer zusammenschließt und die Fusion auslöst (Plempner et al. 2000, Hashiguchi et al. 2007, Hashiguchi et al. 2011a). Hierbei wird durch eine Konformationsänderung des H-Proteins, das F-Protein von der prä-Fusions-

Konformation in die post-Fusions-Konformation umgeformt. Dadurch wird die Fusion mit der Zellmembran initiiert (Plempner et al. 2011).

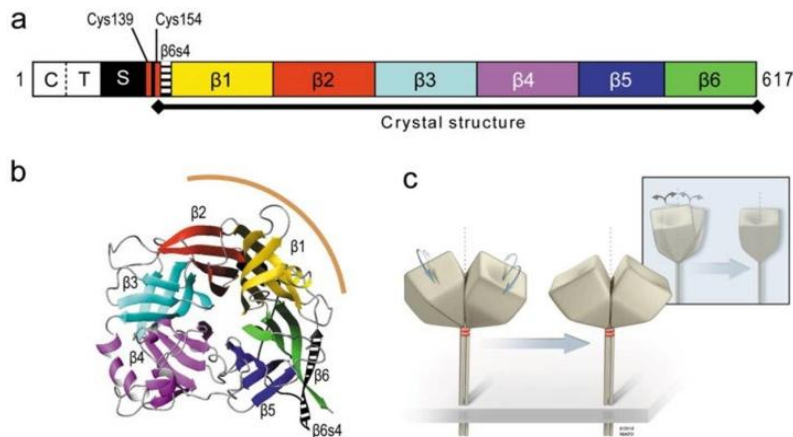


Abbildung 5: Schematische Darstellung des MV-Hämaggglutinins und die Modellstrukturen der Faltung (modifizierte Abbildung nach Navaratnarajah et al. 2011)

Das MV-H-Protein besteht aus einem zytoplasmatischem Bereich (C), einer Transmembrandomäne (T), einer Stielregion (S) und einer β -Propellerstruktur (β 1-6) (a). Die Ansicht von oben zeigt die Anordnung und Faltung der H-Kopfdomäne mit den β 1-6-Propellerstrukturen. Die Interaktionsseite zweier H-Monomere ist in braun gekennzeichnet (b). Das H-Glykoprotein geht über Disulfidbindungen einen Homodimerkomplex ein, wobei die zwei Kopfdomänen voneinander abgewandt sind (c).

1.1.4.6. Die Polymerase

Das Polymerasegen (L) kodiert für die virale RNA-abhängige-RNA-Polymerase und ist das größte Protein der Morbilliviren. Bei CDV hat es eine Nukleotidlänge von 6641 nt und eine Proteinelänge von 2184 aa. Es befindet sich am 5'-Ende des viralen Genoms und ist aufgrund des Transkriptionsgradienten nur in geringen Mengen in infizierten Zellen bzw. im Viruspartikel vorhanden. Die Polymerase bildet mit dem P-Protein über nichtkovalente Wechselwirkungen einen Komplex, der mit dem N-Protein interagiert und die Transkription der viralen mRNA und die Genomreplikation, über ein positivsträngiges Intermediat (Antigenom), ermöglicht (Horikami et al. 1994).

1.1.5. Der Infektions- und Replikationszyklus

Die Ähnlichkeit der Morbilliviren MV und CDV spiegelt sich nicht nur in deren Aufbau und Struktur wieder, sondern auch in dem Infektionszyklus und den Krankheitssymptomen. Die Übertragung von Morbilliviren erfolgt über eine Tröpfcheninfektion. Das Virus gelangt über den respiratorischen Trakt in die Lungen des Wirtes und wird dort über Makrophagen und Dendritische Zellen in den Körper aufgenommen. Letztere wandern in die lokalen Lymphknoten, wo das Virus B- und T-Lymphozyten infiziert (Swart et al. 2007). Im Folgenden verteilt sich das Virus im lymphatischen System des Organismus und kann weitere Organe infizieren (Vries et al. 2010). Lymphoide Zellen werden von MV als Transportvesikel verwendet, um die Infektion und Ausbreitung des Virus im Organismus zu ermöglichen (Frenzke et al.

2013). Diese Verbreitung des Virus erfolgt vermutlich bei allen Morbilliviren über den zellspezifischen Rezeptor SLAM (Tatsuo et al. 2001). Die Entstehung klinischer Symptome geht darüber hinaus mit der Infektion von Epithelzellen einher (Sawatsky et al. 2012). Die Hauptinfektionsorte von CDV sind der respiratorische Trakt, das gastrointestinale, endokrine, lymphatische und vaskuläre System und in einigen Fällen das Gewebe des Zentralen Nervensystems (ZNS, Frisk et al. 1999). Bei MV ermöglichen subepitheliale Immunzellen die Infektion von Epithelzellen des oberen respiratorischen Traktes (Ludlow et al. 2013). Diese Infektion von Epithelzellen mittels des Rezeptors Nectin4 ist dafür verantwortlich, dass das Virus wieder abgegeben wird und sich weiterverbreiten kann (Sawatsky et al. 2012, Frenzke et al. 2013).

Die Infektion mit Morbilliviren erfolgt also über mindestens zwei Rezeptoren, SLAM (CD150) und Nectin4 (siehe 1.4., Tatsuo et al. 2000, Tatsuo et al. 2001, Noyce et al. 2011, Mühlebach et al. 2011, Pratakpiriya et al. 2012). Das H-Protein des Virus bindet zuerst über dessen Kopfdomäne an die V-Domäne des jeweiligen Rezeptors, wodurch es zu einer Konformationsänderung des H-Proteins kommt. Dies wiederum induziert die Bindung des F-Proteins an die Stielregion des H-Proteins und die Insertion des F-Peptids an die Wirtsmembran (Baker et al. 1999, Navaratnarajah et al. 2011). Es folgen Konformationsänderungen des H-F-Komplexes, wodurch das Virus mit der Wirtszelle fusioniert (Lamb und Jardetzky 2007, Chang und Dutch 2012). Durch die Fusion der viralen Hüllmembran und der zellulären Wirtsmembran wird die, im Viruskapsid befindliche, ss(-)RNA als RNP-Komplex in das Zytoplasma der Zelle freigesetzt (Abb. 6). Dieser Komplex beinhaltet die Proteine N, P und L und ermöglicht die Replikation und die Transkription des viralen RNA-Genoms.

Das L-Protein bindet an die Leader-Sequenz am 3'-Ende der viralen RNA (Abb. 3). Diese Sequenz ist weder polyadenyliert noch besitzt sie eine Cap-Struktur. Die viralen Gene werden anschließend vom 3'-Transkriptionsstartsignal bis zum 5'-Transkriptionsstoppsignal transkribiert (Abb. 3, Whelan et al. 2004). In den intergenischen Regionen kann sich die Polymerase von der RNA lösen und die Transkription wird abgebrochen. Je näher die Polymerase an das 5'-Genomende gelangt, desto wahrscheinlicher ist ein Transkriptionsabbruch. Dies resultiert in einem 3'- zu 5'-Transkriptionsgradienten (Abb. 3, Plumet et al. 2005, Wright et al. 2005). Befinden sich genügend N-Proteine im Zytoplasma, wechselt die Polymerase von ihrer Transkriptionsfunktion in die Replikation des viralen Genoms (Plumet et al. 2005). Die viralen mRNAs werden translatiert und die Glykoproteine im Golgi-System modifiziert. Diese werden abschließend an der Zelloberfläche exponiert (Abb. 6). Diese viralen Oberflächenproteine können mit den Rezeptoren benachbarter Zellen interagieren und es kommt zu einer Fusion der beiden Zellen. Ohne eine weitere Virusfreisetzung können so neue Zellen infiziert werden und es bilden sich multinukleäre Riesenzellen oder Synzytien (Messling et al. 2001). Die virale RNA assoziiert intrazellulär umgehend mit dem N-Protein. Das M-Protein bindet an das Nukleokapsid und interagiert des Weiteren mit dem F-Protein. Durch Knospung wird das Viruspartikel von der Wirtszelle freigesetzt und kann erneut Zellen infizieren (Abb. 6).

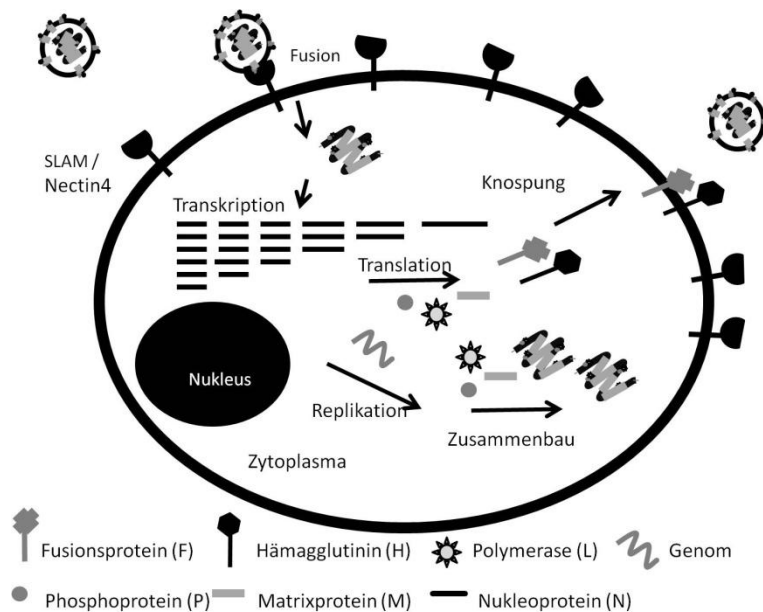


Abbildung 6: Replikations- und Infektionszyklus von Morbilliviren (modifizierte Abbildung nach Vries 2013)

Durch die Interaktion des H-Proteins mit den zellulären Rezeptoren (Nectin4 oder SLAM) und anschließender Fusion, kann das Viruspartikel in die Zelle eindringen. Im Zytoplasma der Zelle findet die Transkription und Translation der monocistronischen RNA statt. Des Weiteren wird dort auch das virale Genom repliziert und der RNP-Komplex, bestehend aus Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P) und Polymerase (L) und RNA zusammengebaut. Die Glykoproteine H und F werden an der Zelloberfläche präsentiert und das Virus verlässt, mittels Knospung, die infizierte Zelle.

1.1.6. Das Hundestaubevirus (CDV)

Das CDV wurde als Erstes von Henri Carré im Jahre 1905 beschrieben (La Carré 1905). Die Bestätigung, dass dieses Virus zu den spezifischen Krankheitssymptomen führte, wurde erst 1926 durch Laidlaw und Dunkin erbracht (Laidlaw und Dunkin 1926). Ein Lebendimpfstoff ist seit 1950 vorhanden und wird vor allem domestizierten Hunden injiziert (Martella et al. 2007). Das traditionelle Impfprogramm empfiehlt hierbei in den ersten sechs Lebensmonaten zwei bis drei Impfungen und dann eine jährliche CDV-Impfung. Wie beim MV, gibt es auch hier keine direkte virale Behandlungsmethode nach Infektion. Da das CDV eine hohe Ähnlichkeit mit dem MV aufweist, dient das CDV auch als Modell für die Erforschung und die Behandlung von MV. Aufgrund des breiten Wirtstropismus und der immer neu entdeckten Wirte, ist eine Ausrottung des Virus nicht möglich.

1.2. Die Pathogenese und Erkrankung

Die, durch das MV und das CDV, hervorgerufenen Erkrankungen sind in den jeweiligen Wirten sehr ähnlich. Bei beiden Viren handelt sich um hoch ansteckende Pathogene, die über Tröpfcheninfektion übertragen werden. Die ersten Symptome, drei bis fünf Tage nach einer Virusinfektion, sind Fieber, Konjunktivitis, Schnupfen, ein sichtbarer makulopapulöser Hautausschlag und die weißen Koplik'schen Flecken

in der Mundschleimhaut. Die ersten klinischen Symptome sind nach sechs bis zehn Tagen zu sehen. Das Hauptkennzeichen einer Morbillivirusinfektion ist die vorübergehende Immunsuppression. Deswegen kann es leicht zu Sekundärinfektionen kommen, welche zum klinischen Krankheitsbild beitragen. Typische Symptome von Morbillivirusinfektionen sind die mukosale Infektion, gastrointestinale und respiratorische Symptome, Lethargie und Dehydrierung, Mittelohrentzündung, Augenentzündung und neurologische Komplikationen (Confer et al. 1975, Summers et al. 1979, Appel und Summers 1995, Messling et al. 2004a, Beineke et al. 2009). Bei den neurologischen Komplikationen unterscheidet man zwischen akuten und persistierenden Infektionen, welche beide zum Tod führen können. So verursachen diese Viren auch eine Akute-Demyelinierende-Enzephalomyelitis (ADEM) oder die Subakute-Sklerosierende-Panenzephalitis (SSPE) beim Menschen bzw. die „old dog encephalitis“ bei Hunden, welche erst Jahre nach der eigentlichen Virusexposition ausbrechen können. Hierbei handelt es sich um multifokale Demyelinisierung der grauen und weißen Substanz des ZNS, wobei das Virus bevorzugt Neuronen, Astrozyten und Oligodendrozyten infiziert (Sips et al. 2007, Beineke et al. 2009). Bei CDV sind die Neurovirulenz und die persistierenden Erkrankungen stärker ausgeprägt als bei MV (Beineke et al. 2009). Ein Unterschied in der Rezeptorverwendung zwischen CDV und MV, zusätzlich zu SLAM (CD150) und Nectin4, könnte dies erklären (Tatsuo et al. 2001). Eine virusinduzierte humorale und zelluläre Autoimmunität kann sich auch gegen eigene Myelin-Antigene richten (Vandevelde und Zurbriggen 1995). Bis heute wird eine mögliche Beteiligung von MV- oder CDV-Infektionen bei der Entstehung von Multipler Sklerose diskutiert (Cook et al. 1979, Haile et al. 1982, Rohowsky-Kochan et al. 1995, Geeraedts et al. 2004). Bis heute gibt es weder für MV-Infektionen noch für CDV-Infektionen eine Therapie oder Medikamente und die Krankheitszeichen der Virusinfektion können nur symptomatisch behandelt werden. Eine Verabreichung von Vitamin A an MV-infizierte Patienten in Afrika zeigte eine Verminderung der Sterblichkeitsrate (WHO et al. 2009, Sudfeld et al. 2010). Die einzige effiziente Schutzmaßnahme vor diesen Infektionen und deren Krankheitsbildern ist bei Menschen eine zweifache Schutzimpfung im Kindesalter und bei Hunden eine regelmäßige Schutzimpfung ab den sechsten Lebensmonaten (siehe 1.1.6.).

1.3. Die Eliminierung des Masernvirus

MV wurde im Jahre 1954 erstmalig von John Enders und Thomas Peebles isoliert (Enders und Pleebes 1954). Darauf folgend wurde die Masernimpfung etabliert, die seit 1963 durchgeführt wird. Vor der Impfeinführung hatten 95% aller Kinder die Masern bis zu ihrem 16. Lebensjahr. Bis in das Jahr 1980 starben geschätzte 2,6 Millionen Menschen weltweit pro Jahr auf Grund einer MV-Infektion und dessen Folgekrankheiten (WHO 2014). Die zunehmenden Impfungen zeigen eine deutliche Abnahme der MV-Infektionen und damit einer Reduktion der Mortalitätsrate. Die ersten Debatten zur Ausrottung von MV wurden schon kurz nach Einführung des Impfstoffs geführt (Sencer et al. 1967). Durch die Verwendung von monoklonalen

Antikörpern und polyvalenten Antiseren konnte gezeigt werden, dass das MV monotypische Antigenunterschiede zwischen den verschiedenen Genotypen aufweist (Tamin et al. 1994, Santibanez et al. 2002, Santibanez et al. 2005). Polyklonale Antiseren geimpfter Probanden können dennoch wildtypisches MV neutralisieren und MV bleibt damit ein serologisch, monotypisches Virus (Santibanez et al. 2005). Die Basisreproduktionsrate R_0 für MV liegt zwischen 12 und 18 und damit ist ein hoher Prozentsatz an Populationsimmunität von Nöten (über 95%), um die Virustransmission zu unterbrechen (Moss und Griffin 2012). Weltweit ist MV eine der führenden Todesursachen von Kindern. Die einzige Schutzmaßnahme gegen MV ist die zweiteilige Impfung im Kindesalter, da in etwa 15% der Fälle die Erstimpfung versagt (WHO 2014). Die erwartete flächendeckende MV-Impfung liegt weltweit bei etwa 84% und davon erreichten 76% dieser Länder einen Impfstatus von über 90% im Jahr 2012 (WHO 2012, WHO 2014). Von 2000 bis 2011 wurde, aufgrund der Impfprogramme, die MV-induzierte Mortalitätsrate um 74% gesenkt (WHO 2012). Im Jahre 2012 waren es etwa 122000 Tote aufgrund einer MV-Infektion (WHO 2014). Über 95% der Maserntoten stammt aus Ländern der Dritten Welt mit einer geringen Gesundheitsversorgung. Die Ziele der WHO sind die Reduktion der weltweiten MV-Mortalität um 95% bis 2015 im Vergleich zum Jahr 2000 und die Eliminierung von Masern und Röteln in mindestens fünf WHO Regionen bis 2020 (WHO 2012). Nach Rinderpestvirus, Pockenvirus und Polio Typ 2 ist es ein weiteres virales Pathogen, dass ausgerottet werden könnte (Bellini und Rota 2011, WHO 2012). Eine Ausrottung des MV ist, aufgrund der weltweiten zunehmenden Impfungen, bis 2020 möglich (Bellini und Rota 2011, WHO 2012).

1.4. Die zellulären Rezeptoren

1.4.1. Das Signaling Lymphocyte Activating Molecule (SLAM; CD150)

SLAM ist ein Typ-I Transmembranprotein und besteht aus 335 aa. Das SLAM beinhaltet eine extrazelluläre Domäne mit zwei Immunglobulin (Ig) ähnlichen Domänen, V-Set und C2-Set, eine Transmembrandomäne und einen zytoplasmatischen Bereich (Abb. 7).

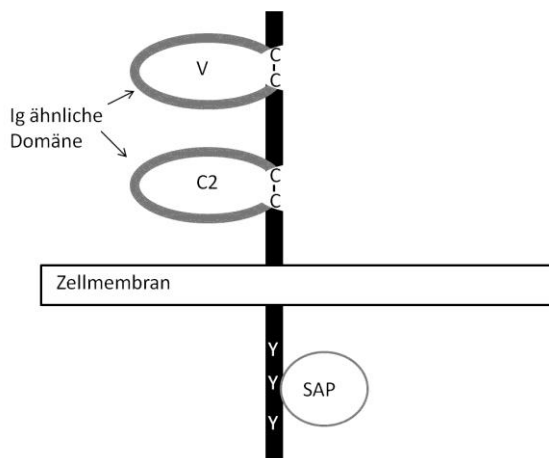


Abbildung 7: SLAM (CD150; modifizierte Abbildung nach Noyce und Richardson 2012)

Das SLAM ist ein Typ-I Transmembranprotein und besteht aus einer Ig-ähnlich Domäne mit einem variablen (V) und konstanten (C) Bereich. Der carboxyterminale Bereich enthält Tyrosin-Phosphorylierungsstellen (Y) und das SLAM-assoziierte-Protein (SAP) ist angelagert. Die Virusbindung und Interaktion mit einem weiteren SLAM erfolgt über die extrazelluläre V-Domäne.

An diesem Bereich binden die Adapterproteine, das SLAM-assoziierte-Protein (SAP) oder das EWS/FLI1-aktivierte Transkript 2 (EAT-2). Die Aktivierung dieser Adapterproteine induziert Signalkaskaden des adaptiven und nichtadaptiven Immunsystems (Veillette et al. 2007). SLAM wird auf Thymozyten, aktivierten Lymphozyten, reifen Dendritischen Zellen, Makrophagen und Thrombozyten exprimiert und ist ein Kennzeichen für primitive hämatopoetische Stammzellen (Kiel et al. 2005, Schwartzberg et al. 2009). Eine Hauptaufgabe des SLAM ist es die Interaktionen zwischen Thymozyten, Lymphozyten oder Antigen präsentierenden Zellen zu fördern und dadurch die Ausbildung einer immunologischen Synapse zu stabilisieren (Ostrakhovitch und Li 2006). Das SLAM interagiert homotypisch mit SLAM auf einer anderen Zelle und kann die Interaktion verschiedener Zellen bewirken (Punnonen et al. 1997). Durch Aktivierung von SLAM auf aktivierten und Gedächtnis-T-Zellen wird die Expression der Th1- und Th2-Zytokine Interferon γ , IL-4 und IL-13 stimuliert (Aversa et al. 1997, Henning et al. 2001, Veillette et al. 2007). Die Morbilliviren verwenden diesen Rezeptor speziesspezifisch als Haupteintrittsweg in die Zellen (Tatsuo et al. 2000, Erlenhoefer et al. 2001, Tatsuo et al. 2001). So ist bekannt, dass das MV sowohl das humane SLAM (hSLAM), als auch das makaken SLAM (mSLAM) benutzen kann (Takeuchi et al. 2012). Das CDV kann sowohl das canine SLAM (cSLAM), als auch das feline SLAM (fSLAM) als Eintrittsrezeptor verwenden (Tatsuo et al. 2001, Hara et al. 2013). Hierbei ist die, von der Zellmembran distal gelegene, V-Domäne des SLAM essentiell für die Interaktion mit Morbilliviren (Ono et al. 2001b). Das virale H-Protein bindet über einen sauren Bereich an den basischen Bereich der aminoterminalen V-Domäne des SLAM (Ono et al. 2001a). Die Aminosäure H61 und die benachbarten Aminosäuren I60 und V63 von SLAM sind für die Interaktion mit dem MV-H von Bedeutung (Ohno et al. 2003). Nach einer MV-Infektion über das SLAM, wird dessen Oberflächenexposition vorübergehend reduziert (Erlenhoefer et al. 2001).

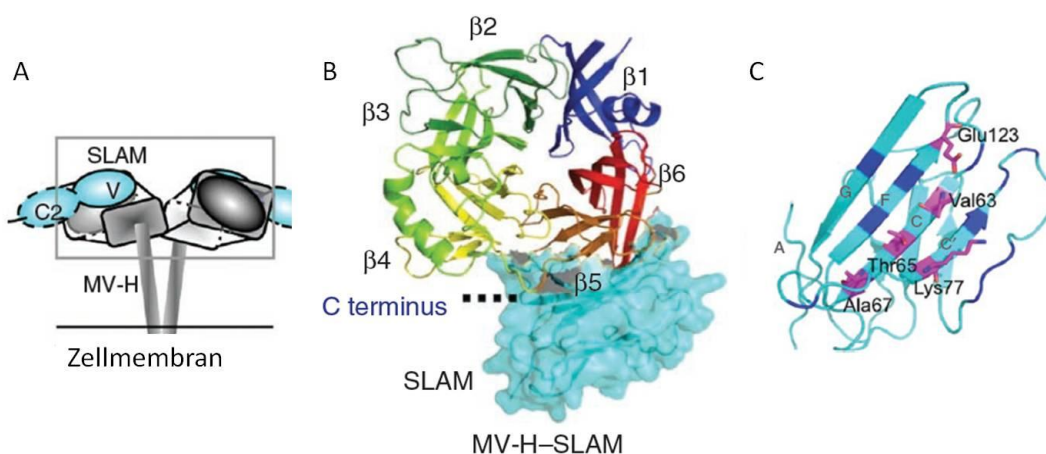


Abbildung 8: Interaktion des SLAM mit dem MV-H (modifizierte Abbildung nach Hashiguchi et al. 2011a)

Die schematische Darstellung zeigt die Bindung des SLAM (blau) über dessen V-Domäne an die Kopfstruktur des MV-H (A). Dabei ist die Interaktionsseite des SLAM (blau) an der $\beta 5$ -Region der H-Propellerstruktur (B). Die Faltung des SLAM ist in C dargestellt und gibt die SLAM-SLAM Bindungsstellen (magenta) wieder.

1.4.2. Das Nectin4

Die Familie der Nectinmoleküle gehört zu den zellulären Adhäsionsmolekülen und besitzt die Struktur der Ig-Superfamilie. Dazu gehören die Nectine 1 bis 4, auch als „Poliovirus Receptor Related“ (PVRL 1-4) bezeichnet, und der prototypische Poliovirusrezeptor (Takai et al. 2008). Die zelluläre Funktion dieser Moleküle ist vielseitig und beinhaltet Polarisierung, Differenzierung, Motilität, Proliferation, das Überleben der Zelle und die Immunerkennung (Zhang et al. 2012, Takai et al. 2008, Ogita und Takai 2006). Des Weiteren werden Nectine von einigen Viren als Rezeptoren für die Infektion verwendet (Geraghty et al. 1998, Cocchi et al. 2001, Campadelli-Fiume et al. 2000, Ogita et al. 2010). Kürzlich wurde von zwei Gruppen unabhängig gezeigt, dass das MV das humane Nectin4 (hN4) als Eintrittsrezeptor verwenden kann (Mühlebach et al. 2011, Noyce et al. 2011). Ebenso verwendet CDV das canine Nectin4 (cN4) als Rezeptor (Noyce et al. 2013, Otsuki et al. 2013b, Pratakpiriya et al. 2012).

Das Nectin4 ist ein Typ-I Transmembranprotein und besteht aus einer Ig-ähnlichen V-Domäne (V), zwei C2-typischen Domänen (C), einer Transmembrandomäne und einem zytoplasmatischen Bereich (Abb.9, Noyce und Richardson 2012). Neben der Expression im somatischen Gewebe, wie z.B. Tracheen, Lunge, Haut, Prostata und Magen, wird Nectin4 auch in Tumorzellen exprimiert (Reymond et al. 2001, Brancati et al. 2010, Noyce et al. 2011). Vor allem in Lungen-, Brust-, und Ovarialtumoren wird Nectin4 stark exprimiert und daher auch als Tumormarker verwendet (Takano et al. 2009, Derycke et al. 2010, Mühlebach et al. 2011, Pavlova et al. 2013). Für das canine Nectin4 wurden zwei Splice-Varianten gefunden, die sich in einer 25 aa langen Deletion im zytoplasmatischen Bereich unterscheiden (Noyce et al. 2013). Der Unterschied ist jedoch für die Infektionseffizienz irrelevant (Noyce et al. 2013).

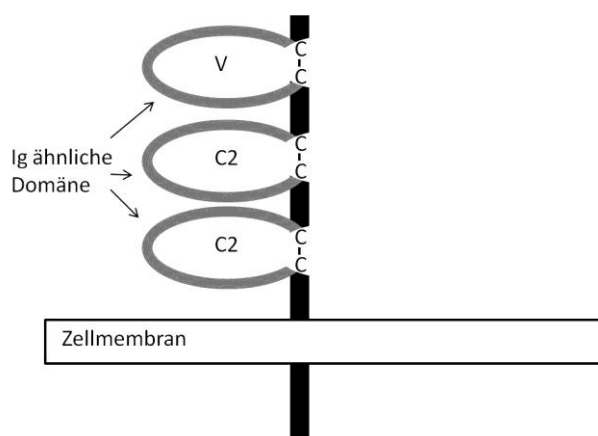


Abbildung 9: Nectin4 (modifizierte Abbildung nach Noyce und Richardson 2012)

Das Nectin4 ist ein Typ I Transmembranprotein und besteht aus einer Ig-ähnlichen Domäne mit einem variablen (V) und zwei konstanten (C) Bereichen. Die Virusbindung erfolgt über die extrazelluläre V-Domäne.

Die Interaktion zwischen Nectin4 und den Morbilliviren wurde vor kurzem mit Hilfe des Masernvirus analysiert. Dabei konnte der Kontakt des MV-H mit der V-Domäne des humanen Nectin4 gezeigt werden (Mühlebach et al. 2011, Noyce et al. 2011). Die Rezeptorbindestelle des MV-H befindet sich hierbei in der hydrophilen Fuge der $\beta 4/\beta 5$ -Schleife (Abb. 10, Zhang et al. 2012, Mateo et al. 2013). Eine Infektion von

Epithelzellen erfolgt über die basolaterale Seite mittels des Nectin4 (Sinn et al. 2002, Mühlebach et al. 2011). Nach Infektion gelangt das Virus über die apikale Zellseite in das Lungenlumen (Leonard et al. 2008, Ludlow et al. 2009, Mühlebach et al. 2011). Die infektiösen Partikel werden dann aerogen oder mittels Tröpfchen auf neue Wirte übertragen (Racaniello 2011). Studien haben gezeigt, dass die Interaktion des CDV-H mit Nectin4 wesentlich zur Verbreitung des Virus und der Abgabe in das Lungenlumen beiträgt. Anhand von Mutationen im H-Protein kann die Interaktion des Virus mit dem Nectin4 unterbunden werden (Nectin4blind Virus, Leonard et al. 2008, Sawatsky et al. 2012). Diese veränderten viralen Partikel werden nicht mehr in das Lungenlumen abgegeben und verbleiben an der basolateralen Seite der Epithelzelle (Leonard et al. 2008, Sawatsky et al. 2012). Des Weiteren induzieren Nectin4-blind - CDV-Partikel keine klinische Symptomatik (Leonard et al. 2008, Sawatsky et al. 2012). Die immunsuppressive Fähigkeit von Morbilliviren ist jedoch Nectin4 unabhängig (Leonard et al. 2008, Sawatsky et al. 2012).

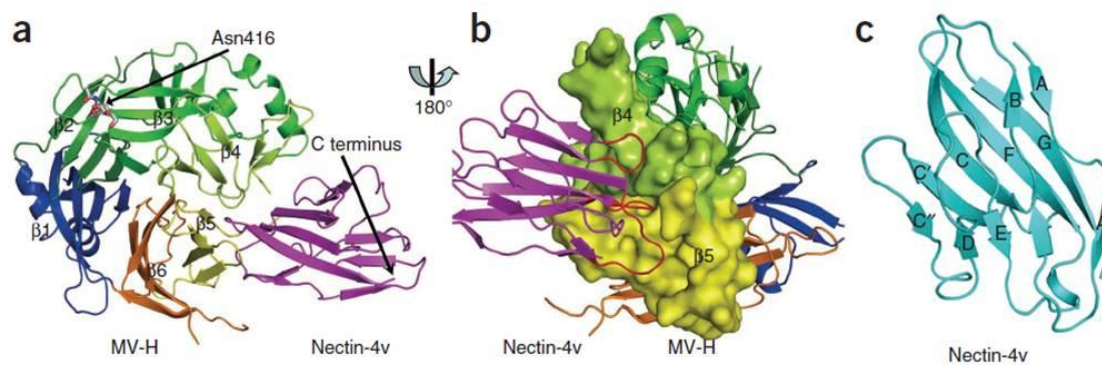


Abbildung 10: Interaktion des Nectin4 mit dem MV-H (Zhang et al. 2012)

Die Modellstrukturen zeigen die Interaktion des Nectin4 (lila) mit dem Hämagglutinin des Masernvirus (MV-H). Hierbei erfolgt die Bindung an die V-Domäne des Rezeptors über die β 4- und β 5-Furche des MV-H (a). Ein um 180° rotiertes Nectin4 ist in b zu sehen und ein einzelnes Nectin4 ist in c dargestellt.

1.5. Vorarbeiten zu dieser Arbeit

Das CDV ist ein hoch ansteckendes Pathogen, welches eine Vielzahl von Spezies infizieren kann. Der breite Wirtstropismus und die steigende Anzahl von neuen CDV-Infektionen bisher CDV-negativer Spezies, wie Löwen, Tiger und sogar Affen, lässt die Vermutung zu, dass es auch Menschen infizieren könnte. Im Gegensatz zu CDV hat MV einen eingeschränkten Wirtstropismus, da es natürlicherweise nur Menschen und nur sehr bedingt wenige Affenarten infiziert. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) hat das Ziel erklärt durch weltweite Masernimpfungen das MV zu eliminieren. Mit zunehmenden Impfkampagnen und einer weltweiten Impfquote über 95% erscheint die Ausrottung von MV bis 2020 durchführbar (Bellini und Rota 2011, WHO 2012). Mit der Ausrottung des MV würde aber auch die Masernimpfung gestoppt werden. Mit der Zeit könnte daher, sowohl der durch natürliche Infektion erworbene Schutz gegenüber Reinfektion, als auch der Impfschutz der Menschen verloren gehen. In diesem Falle bestünde die Möglichkeit, dass andere Morbilliviren, wie CDV, die

Speziesbarriere zum Menschen überschreiten und sich an den humanen Wirt anpassen könnten.

Die erste Barriere der CDV-Infektion von humanen Wirtszellen ist die Aufnahme in die Zielzelle und damit verbunden eine notwendige Interaktion der CDV-Glykoproteine mit den zellulären Rezeptoren. In ersten Versuchen zu diesem Thema hat Jung Woo Han in seiner Diplomarbeit die Infizierbarkeit humaner epithelialer H358 Zellen, die den Rezeptor (hEpR, jetzt bekannt als Nectin4) exprimieren, und Vero-Zellen, die hSLAM exprimieren, mit wildtypischem rekombinantem CDV-A75/17red untersucht (Han J. W. 2010). Bemerkenswert ist, dass schon bei der initialen Infektion (Passage 1) eine signifikante Virusreplikation zu beobachten war. Innerhalb der ersten drei Passagen war eine Zunahme der Rotfluoreszenz über die Inkubationszeit und damit eine Zunahme der Virusreplikation in den einzelnen Passagen detektierbar (Abb. 11 und 12). Des Weiteren wurde in beiden untersuchten Zelllinien mit zunehmender Viruspassagierung eine Abnahme der benötigten Inkubationstage deutlich. Diese ersten Versuche ließen vermuten, dass es sich hier entweder um eine schnelle und effiziente Adaptierung mit dem Auftreten neuer Mutationen und anschließender Selektion, oder eine Selektion bereits vorhandener Mutationen handeln könnte.

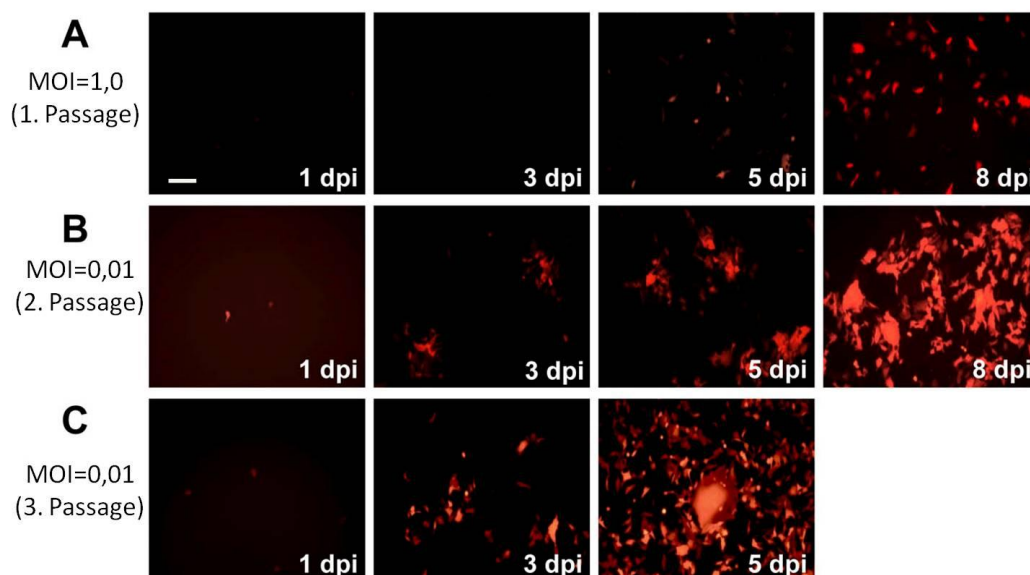


Abbildung 11: Infektion der humanen Epithelzelllinie H358 mit CDV-A75/17red (Bieringer et al. 2013)

Die Nectin4-exprimierende Zelllinie H358 wurde mit rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red mit einer MOI von 1 für die erste Passage infiziert (A). Die Fluoreszenzbilder zeigen jeweils die unterschiedlichen Zeitpunkte des Infektionsverlaufes. Nach acht Tagen wurde das Virus geerntet, auf Vero-cSLAM-Zellen titriert und anschließend auf H358-Zellen für die zweite Passage mit einer MOI von 0,01 reinfiziert (B). Nach acht Tagen wurde das Virus wiederholt geerntet, titriert und auf H358-Zellen für die 3. Passage mit einer MOI von 0,01 reinfiziert (C). Fotomikroskopische Aufnahmen der Fluoreszenz des tdTomato-Rot-exprimierenden Virus wurden unter UV-Licht gemacht (bar = 200 µm).

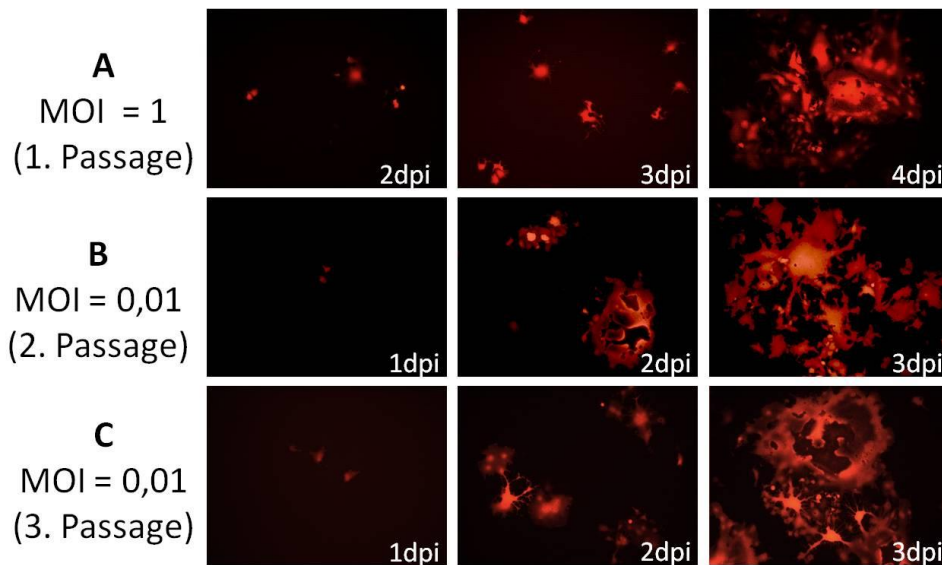


Abbildung 12: Infektion der Vero-hSLAM Zelllinie mit CDV-A75/17red (modifizierte Abbildung nach Han J. W. 2010)

Die Zelllinie Vero-hSLAM wurde mit rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red mit einer MOI von 1 für die erste Passage infiziert (A). Die Fluoreszenzbilder zeigen jeweils die unterschiedlichen Zeitpunkte des Infektionsverlaufes. Nach vier Tagen wurde das Virus geerntet, auf Vero-cSLAM-Zellen titriert und anschließend auf Vero-hSLAM-Zellen für die zweite Passage mit einer MOI von 0,01 reinfiziert (B). Nach drei Tagen konnte das Virus wiederholt geerntet, titriert und auf Vero-hSLAM Zellen für die dritte Passage mit einer MOI von 0,01 infiziert werden (C). Fotomikroskopische Aufnahmen der Fluoreszenz des tdTomato-Rot-exprimierenden Virus wurden unter UV-Licht gemacht (n=1, 10-fach Vergrößerung).

Auch die Titeranalysen der beiden Adaptierungsprozesse zeigten eine Zunahme der infektiösen Partikel innerhalb der ersten drei Passagen (Abb. 13). In der ersten Viruspassage konnten sowohl aus den infizierten H358-Zellen als auch aus den infizierten Vero-hSLAM-Zellen 10^4 pfu/ml infektiöse Viruspartikel isoliert werden. Im Vergleich zur ersten Passage war nur mit dem hSLAM-adaptierten Virus ein deutlicher Anstieg an viralen Partikeln messbar. Hingegen war der virale Titer in der dritten Passage von infizierten H358-Zellen und Vero-hSLAM Zellen vergleichbar (10^5 pfu/ml). Dies zeigte, dass sich das parentale CDV-A75/17red sehr schnell an die benutzen Zielzellen anpasst. Zu dem Zeitpunkt war noch nicht klar, ob dies tatsächlich eine Adaptation an die humanen Rezeptoren Nectin4 und CD150 war.

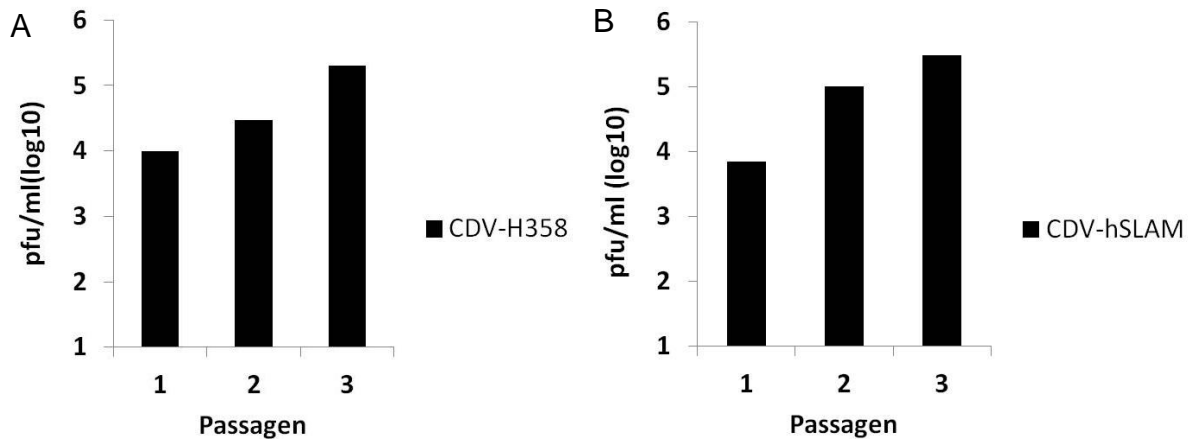


Abbildung 13: Virustiter von CDV-A75/17red auf H358-Zellen und Vero-hSLAM-Zellen (modifizierte Abbildung nach Han J. W. 2010)

CDV-A75/17red wurde auf H358-Zellen passagiert und der Titer der jeweiligen Passage auf Vero-cSLAM-Zellen mittels Plaquetest detektiert. Das an H358-adaptierte CDV-A75/17red hat einen Titer von 10^4 pfu/ml in der erste Passage, in der zweite Passage einen Titer von 5×10^4 pfu/ml und in der dritten Passage einen Titer von 5×10^5 pfu/ml (A, n=1 Han J. W. 2010). Die Titer der Passagen von CDV-A75/17red auf Vero-hSLAM-Zellen wurden auf Vero-cSLAM Zellen mittels Plaquetest detektiert. Das an hSLAM -adaptierte CDV-A75/17red hat einen Titer von 7×10^3 pfu/ml in der erste Passage, in der zweite Passage einen Titer von 10^5 pfu/ml und in der dritten Passage einen resultierenden Titer von 3×10^5 pfu/ml (B, n=1 Han J. W. 2010).

Bei einer natürlichen CDV-Infektion des Menschen müsste, über die Adaptierung an humane Rezeptoren hinaus auch eine Anpassung an das angeborene und intrinsische humane Immunsystem, mit seinen intrazellulären Mechanismen, in den primären Zielzellen stattfinden, um eine effektive Virusvermehrung zu erlauben. Bis heute ist eine CDV-Infektion des Menschen jedoch nicht bekannt. Es konnten, bis jetzt, nur in Einzelfällen CDV-spezifische Antikörper im Menschen nachgewiesen werden (Rohowsky-Kochan et al. 1995). In Tierversuchen konnte gezeigt werden, dass mit Masernimpfstoff geimpfte Hunde auch gegen CDV-Infektion geschützt sind und es nur vereinzelt zu einer abgeschwächten Erkrankung kommt (Taylor et al. 1991). Umgekehrt ist anzunehmen, dass neutralisierende MV-Antikörper den Menschen auch vor CDV-Infektion schützen. Eine überstandene, natürliche MV-Infektion oder eine Masernimpfung des Menschen würde somit auch vor einer CDV-Infektion schützen. Jedoch könnte CDV nach Ausrottung des MV und Beendigung der MV-Impfung möglicherweise auch Menschen infizieren. Welche molekularen Mechanismen zur Ausbildung der Speziesbarriere verantwortlich sind, ist nicht bekannt.

1.6. Zielsetzung der Arbeit

In dieser Arbeit sollten die molekularen Grundlagen der Speziesbarriere zwischen CDV und dem Menschen analysiert werden. Dabei sollten molekulare Veränderungen des CDV bestimmt werden, die eine Infektion humaner Zellen erleichtern könnten. Insbesondere sollte dabei CDV experimentell an humane Wirtszellen adaptiert werden, um die genauen Bedingungen für Rezeptorbenutzung und intrazelluläre Replikation definieren zu können. Durch die Adaptierung von CDV an humane Rezeptoren sollten die benötigten Mutationen für die Benutzung der humanen Rezeptoren und die Wahrscheinlichkeit des Auftretens dieser Mutationen untersucht werden. Anhand von Viruspassagierung und Titeranalysen sollte der zeitliche Ablauf der Adaptierung beobachtet werden. Sequenzanalysen von parentalen und adaptierten Viren sollten einen Einblick in die notwendigen Mutationen im viralen Genom als auch in den viralen Proteinen geben. Des Weiteren sollte die Wachstumskinetik angepasster Viren untersucht werden, um die Auswirkungen der Adaptierung auf die virale Replikation zu untersuchen. Die Adaptierung von CDV an humane Wirtszellen sollte zeigen, wie schnell und mit welchen molekularen Veränderungen es möglich ist diese erste Barriere zu humanen Zielzellen zu überschreiten. Dabei ist anzumerken, dass keine vollständig humanpathogenen Viren selektiert werden sollten und dass die Arbeiten unter entsprechenden Sicherheitsvorkehrungen durchgeführt wurden, um eine Infektion von Menschen auszuschließen.

2. Material

2.1. Reagenzien

10 mM dNTP Mix	Thermo Scientific
25 mM MgCl ₂	Thermo Scientific
Bacto Agar	BD Pharmingen
Bacto Hefeextrakt	BD Pharmingen
Bovines Serum Albumin	AppliChem
Bromphenolblau	Sigma
CaCl ₂	Sigma
Chloroform	AppliChem
DABCO/TEDA	Sigma
D-Glucose	Sigma
DMSO	AppliChem
EDTA	AppliChem
Essigsäure	AppliChem
Ethanol	AppliChem
Gel Red	Genaxxon
Gene Ruler 1 kb DNA-Ladder	Fermentas
Gene Ruler 100 bp Plus-DNA-Ladder	Fermentas
Glycerol	AppliChem
H ₂ O _{HPLC}	AppliChem
Isopropanol	Roth
Kaliumacetat	Ferka
KCl	Ferka
KH ₂ PO ₄	Ferka
LE-Agarose	Biozym
MnCl ₂	Applichem
MOPS	ICN Biomedicals
Moviol	Calbiochem
NaCl	AppliChem
NaHCO ₃	Merck
NaHPO ₄	Applichem
Neutralrot	Merck
Paraformaldehyd	Applichem
PegGold	Peqlab
Phenol	Roth
Polyethylenim	Polysciene
RbCl	AppliChem
Saccharose	AppliChem
Salzsäure	AppliChem
SDS	AppliChem
Tris	AppliChem
Triton X-100	AppliChem
TRizol	Invitrogen
Trypton	AppliChem
Xylenblau	Applichem

2.2. Puffer und Lösungen

X%ige BSA-Lösung	gelöst in sterilem PBS-Puffer
10 x Puffer-E	Promega
10 x CIAP-Puffer	Fermentas
10 x Klenow-Puffer	Fermentas
10 x Multicore-Puffer-10	Fermentas
10 x NTE-Lösung	0,1 M Tris, 1 M NaCl, 0,01 M EDTA in H ₂ O gelöst
10 x Puffer-D	Promega
10 x Puffer-H	Promega
10 x T4-DNA-Ligase-Puffer	Fermentas
10 x Taq-Puffer mit KCl	Thermo Scientific
25%ige Saccharose-Lösung	gelöst in 1 x NTE-Puffer
4% Paraformaldehyd	2 g Paraformaldehyd, 10 µl 10 mM NaOH in 50 ml H ₂ O
50 x TAE-Puffer	1 mM EDTA-Na ₂ -Salz, 40 mM Essigsäure, 40 mM Tris in H ₂ O gelöst
5x BDT-Puffer	Life Technologies
5x M-MLV-RT-Puffer	Promega
5x Phusion-Green-HF-Puffer	Thermo Scientific
6 x DNA-Ladepuffer	0,03% (v/v) Bromphenolblau, 60% (v/v) Glycerol, 60 mM EDTA-Na ₂ Salz, 10 mM Tris-HCl, 0,03% (v/v) Xylenblau in H ₂ O gelöst, pH 7,6
ATV-Lösung	5 mM D-Glucose, 137 mM NaCl, 200 mg/l Na ₄ EDTA, 70 mM NaHCO ₃ , 5,4 mM KCL, 500 mg/L Trypsin in H ₂ O gelöst
FACS-Puffer	0,4% BSA, 0,02% Na-Azid in PBS (Ca ²⁺ / Mg ²⁺ frei) gelöst
M-MLV-RT-Puffer 5x	Promega
Moviol-Lösung	2,4 g Moviol, 6 g Glycerol, 0,2 M Tris-HCl pH 8,5, 2,5 % (w/v) DABCO
PBS-Lösung	1,5 mM CaCl ₂ , 2,7 mM KCl, 1,4 mM KH ₂ PO ₄ , 1 mM MgCl ₂ , 137 mM NaCl, 4,3 mM NaHPO ₄ in H ₂ O gelöst
TFB-I	10 mM CaCl ₂ , 15% (v/v) Glycerol, 100 mM RbCl, 50 mM MnCl ₂ , 30 mM Kaliumacetat pH 5,8
TFB-II	10 mM RbCl, 75 mM CaCl ₂ , 15% Glycerol 10 mM MOPS pH 7,0

2.3. Geräte

-80 °C Truhe	Sanyo
Bakterienschüttler Certomat ® H	B Braun
Brutschrank für Bakterien	Heraeus
Brutschrank für Zellkultur	Heraeus
Drehschüttler	Hartenstein
Einfrierbox	Hartenstein
Eismaschine AF30	Sctosman
FACS Calibur	Beckton Dickson
Feinwaage L610D	Sartorius
Fluoreszenzmikroskop Leica DMIRE2	Leica

Gefrierschrank	Bosch
Gelkammer für Agarosegel	Institut für Virologie und Immunbiologie
Homogenisator	Hartenstein
Kühlschrank	Siemens
Laborwaage EW-3000-2M	Kern
Lichtmikroskop 090-135-002	Leica
Lichtplatte	Kaiser
Mikrowellengerät	Panasonic
Multipipette	Eppendorf
Neubauer Zählkammer	HGB
pH-Meter	Bio Toledo
Photometer	Eppendorf
Pipette 10 µl, 200 µl, 1000 µl	Eppendorf
Sequenzierapparat ABO PRISM® 310 Genetic Analyzer	Advanced Biolab Service
Spectrophotometer Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Sterilwerkbank BSB 4A	Gelaire
Thermoblock	Liebisch
Thermoblock Thermostat 5320	Eppendorf
Thermocycler	Eppendorf
Thermometer	Hartenstein
Tischzentrifuge Mikro200	Hettich
UV-Transilluminator Gel Jet Imager	Intas
Wasserbad	Köttermann
Wippschüttler WS5	Edmund Bühler
Zellsortierung	
Zentrifuge Rotanta 460R	Hettich

2.4. Primer

Oligo dT ₁₈ Primer (0,5 µg/µl)	Thermo Scientific
Random Primer (500 µg/ml)	Promega
Selbst generierte Primer (100 µM)	Sigma Aldrich

Amplifikations- und Sequenzierungsprimer mit PCR-Programm sind im Anhang (6.) gelistet.

2.5. Enzyme

<i>Bam</i> HI	Promega
BDT-Enzym-Mix	Life Technologies
<i>CIAP</i>	Fermentas
<i>Eco</i> RI	Promega
<i>Hind</i> III	Promega
<i>Klenow-Fragment</i>	Fermentas
<i>M-MLV-Reverse-Transkriptase</i>	Promega
<i>Not</i> I	Promega
<i>Phusion Green Hot Start II High Fidelity DNA Polymerase</i>	Thermo Scientific
<i>Sma</i> I	Fermentas

<i>T4-DNA-Ligase</i>	Fermentas
<i>Taq-DNA-Polymerase (recombinant)</i>	Fermentas
<i>Xho I</i>	Promega

2.6. Kitsysteme

Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
PureTaq Ready-To-Go-Beads	GE Healthcare
QIA prep® Spin Miniprep Kit	QIAGEN
QIA quick® Gelextraktion Kit	QIAGEN
Qiagen Plasmid Maxi Kit	QIAGEN
Venor-Gem Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR	Minerva Biolabs

2.7. Antikörper

5C6 anti-human CD150	Exbio
A12 anti-human CD150	BD Pharmingen
Alexa Fluor 488 goat anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen
Alexa Fluor 594 goat anti-mouse IgG (H+L)	Invitrogen
FITC Immunglobulin rabbit anti-mouse	Dako A/S
Human Nectin4 monoclonal Maus IgG _{2B} (MAB 2659)	R&D Systems
Isotyp IgG 1κ Maus 8 (clone MOPC-31C)	BD Pharmingen

2.8. Zellen

293T	Humane embryonale Nierenzellen exprimieren den SV 40 T-Antigen, Institut für Virologie und Immunbiologie
BJAB	Humane EBV-negative Burkitt's Lymphoma Zelllinie, Institut für Virologie und Immunbiologie
H358	Humane Bronchioalveolare Adenokarzinoma Zelllinie NCI-H358 Sigma-Aldrich (Nr. 95111733)
Raji	Humane EBV-positiv Burkitt's Lymphoma Zelllinie, Institut für Virologie und Immunbiologie
Raji-DC-SIGN	DC-SIGN exprimierende Raji-Zellen, Institut für Virologie und Immunbiologie
Vero	Nierenzellen aus grünen Meerkatzen, Institut für Virologie und Immunbiologie
Vero-cN4	canines Nectin4-exprimierende Vero-Zellen
Vero-cSLAM	canines SLAM-exprimierende Vero-Zellen, eine Gabe von Dr. Y. Yanagi, Fukuoka, Japan
Vero-hN4	humanes Nectin4 exprimierende Vero-Zellen
Vero-hSLAM	humanes SLAM exprimierende Vero Zellen, eine Gabe von Dr. Y. Yanagi, Fukuoka, Japan

2.9. Bakterien

XL-10 Gold	Stratagene
------------	------------

2.10. Medien

2% Agar	Medienküche des Institut für Virologie und Immunbiol
Doppel-MEM	Medienküche des Institut für Virologie und Immunbiologie
FCS	GIBCO, Zur Verwendung von FCS wurde tiefgefrorenes FC-Serum bei 37°C aufgetaut und für 30 min bei 56°C inaktiviert. Die Lagerung erfolgte bei 4°C gelagert
LB-Agar mit Antibiotika	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl, 1,5% (w/v) Agar, Antibiotika (Ampicillin 100 µg/ml; Kanamycin 30 µg/ml) auf 1 l H ₂ O
LB-Medium	10 g Trypton, 5 g Hefeextrakt, 5 g NaCl auf 1 l H ₂ O
Medium-Agar-Mischung	60 ml 2%iger Agar, 60 ml Doppel MEM, 40 ml 5% FCS-haltigem MEM
MEM	Hergestellt in der Medienküche des Institutes für Virologie und Immunbiologie, Zugabe 15 ml 5,6% (w/v) NaHCO ₃ -Lösung, Antibiotika und bestimmter FCS-Konzentration
RPMI 1640	Hergestellt in der Medienküche des Institutes für Virologie und Immunbiologie

2.11. Antibiotika

Ampicillin	AppliChem
Antibiotika-Mix für Zellkulturmedium	100 µg/ml Penicillin und 100 µg/ml Streptomycin
Kanamycin	AppliChem
Penicillin	AppliChem
Streptomycin	AppliChem

2.12. Plasmide

pF6gW-DsRed	Lentiviraler Vektor der DsRed exprimiert (Ampicillin resistent)
pF6gW-hN4	humanes Nectin4-exprimierender Vektor (Ampicillin resistent)
pCMV-hN4	humanes Nectin4-exprimierender Vektor (Kanamycin resistent)
pMDLg-/pRRE	HIV-gag und -pol exprimierender Vektor (Ampicillin resistent)
pRSV-rev	HIV-rev exprimierender Vektor (Ampicillin resistent)
pVSV-G	VSV-G exprimierender Vektor (Ampicillin resistent)

2.13. Verbrauchsmaterial

10 cm x 1,5 cm Schale	Nunc
6-, 96- Napfplatte	Greiner
Chamber slides	Thermo Fischer Scientific
Kryoröhrchen	Nunc
Einweg Skalpell	Hartenstein
0,5 ml 1,5 ml und 2 ml Röhrchen	Eppendorf
Küvetten	Hartenstein
Millipore Filter mit 100`000 MWCO	Amplicon
Bakterienplatten	Hartenstein

Plastikpipetten 5 ml 10 ml	Greiner
Spitzen	Roth
Sterilfilter 0,22 µm, 0,45 µm	Harstenstein
Parafilm	Harstenstein
Zellkulturflaschen 25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²	Greiner
Zellschaber	Hartenstein

2.14. Viren

CDV-A75/17red	neurovirulenter, wildtypischer rekombinanter CDV Stamm mit dem TdTomato-Fluoreszenzgen in der 4. Expressionskassette. Ursprünglich isoliert aus dem Gehirn von CDV-infizierten Hunden
CDV-OSP-LP	CDV-Impfstamm Onderstepoort (Large-Plaque)
CDV-hSLAM	An humanes SLAM-adaptierte CDV-A75/17red
MV-IC323eGFP	Wildtypischer, rekombinanter Masernvirus-Stamm mit einem eGFP-Gen
Lentiviraler Virus pRRL-cN4	Kodiert für canines Nektin4 eine Gabe von Phillipe Plattet
CDV-H358	An die Zelllinie H358 adaptiertes CDV A75/17red

2.15. Software

3DLigandSite	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/3dligandsite
Cellquest Pro	Becton Dickson
IM50	Leica
Gel IX Imager Intas GDS	Intas
Lasergene (MegAlign, Primerselect, SeqBuilder)	DNASTAR
Office 2007	Microsoft
Nanodrop 2000	Thermo Scientific
Adobe Photoshop CS3	Adobe
Phyre2	http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre/

3. Methoden

3.1. Zellbiologische Methoden

3.1.1. Kultivierung von Zellen

3.1.2. Zellen einfrieren und auftauen

Zur Konservierung von Zelllinien wurden 1×10^7 Zellen in fetalem Kälber Serum (FCS) mit 10% Dimethylsulfoxid (DMSO) resuspendiert, in ein Kryoröhrchen überführt und mit Hilfe einer Einfrierbox in der -80°C Gefriertruhe langsam tiefgefroren ($-1^{\circ}\text{C}/\text{min}$). Ein langsames Einfrieren von Zellen ist notwendig, um mögliche Kristallbildung in den Zellen und damit verbundene Zellschädigung zu vermeiden. Anschließend konnten die Kryoröhrchen in Stickstoff gelagert werden. Zum Auftauen der Zellen müssen diese schnell in 10 ml 37°C warmes Medium überführt werden und für 5 min bei 300 g zentrifugiert werden. Dadurch wird verhindert, dass das DMSO die Zellen schädigt. Das Zellpellet wurde daraufhin in frischem Medium resuspendiert und auf Zellkulturflaschen verteilt. Eine Kultivierung der Zellen erfolgte bei 5% CO_2 und 37°C .

3.1.3. Passagierung von Zellen

Es wurden 100% konfluente Zellen mit 10 ml ATV-Lösung gewaschen und mit verbleibenden 2 ml ATV inkubiert. Durch die Inkubation mit dem Enzym *Trypsin* werden extrazelluläre Proteine gespalten und die adhären Zellen können sich von dem Flaschenboden lösen. Danach wurde die Zellsuspension mit 37°C warmem Medium vermischt, so dass das *Trypsin*, durch die Zugabe des FCS, inaktiviert wurde. Ein Teil der Zellen kann anschließend weiterkultiviert werden.

3.1.4. Zellzahlbestimmung

Für die Zellzahlbestimmung wurden die Zellen in Suspension resuspendiert, um Zellaggregate zu vermeiden. Dann konnten 10 μl der Zellsuspension auf eine Zählkammer pipettiert und anschließend die Zellzahl bestimmt werden. Hierfür wurde eine Neubauer Zählkammer verwendet. Das Deckglas muss so angelegt werden, dass die newtonschen Interferenzfarben sichtbar sind. Daraufhin wurde die Anzahl lebender Zellen in den vier großen Eckquadraten nach dem L-Prinzip gezählt, der Mittelwert berechnet und der Verdünnungsfaktor einberechnet.

Für eine Neubauer Zählkammer lautet die Formel:

—

3.2. Virologische Methoden

3.2.1. Viruszucht und Passagierung

Für eine Virusanzucht wurden 70-80% konfluente Zellen ohne FCS-haltigem Medium mit einer „Multiplicity Of Infection“ (MOI) von 0,01 infiziert und für 3 h im 37°C Brutschrank inkubiert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel zu FCS-haltigem Medium und die Zellen wurden nach einem Tag 1:2 gesplittet. Bei einem Adaptierungsprozess des Virus wurde eine MOI von 1 für die erste Passage und für folgende Passagen eine MOI von 0,01 verwendet. Des Weiteren wurden bei dem Adaptierungsprozess die Zellen nach einem Tag nach Infektion (dpi) nicht gesplittet, um einen Verlust der viralen Infektion zu vermeiden. Bis die Zellen vollständig infiziert waren, wurden diese bei 37°C bzw. 33°C im Brutschrank kultiviert. Sobald die Zellkulturflaschen vollständig infiziert waren, konnten diese mit 2 ml Mediumüberstand bei -80°C eingefroren werden.

Die Formel für die Berechnung des Virusvolumens lautet:

3.2.2. Wachstumskurven von Virusinfektionen

Eine virale Wachstumskurve gibt den Verlauf der Virusvermehrung über einen bestimmten Zeitrahmen wieder. Die Kinetik zeigt den Infektionsverlauf auf bestimmten Zelllinien und gibt Aufschluss über die Replikationsrate des Virus. Für diese Wachstumskinetik wurde über einem Zeitraum von fünf Tagen im Abstand von 24 h das Fortschreiten der Virusausbreitung mittels Fluoreszenzmikroskopie protokolliert und jeweils die infizierten Zellen einer Zellkulturflasche mit 1 ml Überstand für die Titerbestimmung geerntet.

3.2.2.1. Virusvermehrung auf adhärennten Zellen

Für die Erstellung einer viralen Wachstumskurve wurden zuerst 4×10^5 adhärennte Zellen in einer 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät und am folgenden Tag mit einer MOI von 0,01 in 2,5 ml FCS-freien Medium für 3 h bei 37°C infiziert. Es folgte ein Mediumwechsel zu 1% FCS-haltigem Medium und eine Kultivierung bei 33°C.

3.2.2.2. Virusvermehrung auf Suspensionszellen

Für die Erstellung einer viralen Wachstumskurve wurden zuerst $1,5 \times 10^6$ Suspensionszellen in einer 25 cm² Zellkulturflasche ausgesät und anschließend sofort mit einer MOI von 0,01 in 2,5 ml 10% FCS-haltigem RPMI 1640 Medium für 3 h bei 37°C infiziert. Nach zwei Tagen folgte eine Zugabe von 5 ml 10% FCS-haltigem RPMI 1640 Medium.

3.2.3. Virusinfektion für RNA-Isolation

Es wurden 70-80% konfluenten Zellen mit einer MOI von 0,1 im FCS-freien Medium für 3 h bei 37°C infiziert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel zu 5% FCS-haltigen Minimal Essential Medium (MEM) und eine Inkubation für einen Tag bei 37°C. Die RNA wurde nach dem PegGold-Protokoll (siehe 3.3.2.2) aus den infizierten Zellen isoliert.

3.2.4. Viruspräparation

Die Isolierung von Viruspartikel aus infizierten Zellen erfolgte mit der „Freeze-thawing“ Technik. Diese Technik führt dazu, dass die infizierten Zellen aufgebrochen und zerstört werden, und dadurch das Virus aus den Zellen freigesetzt wird. Hierfür wurden Zellkulturflaschen mit infizierten Zellen bei -80°C für mindestens 24 h eingefroren, anschließend bei 4°C aufgetaut und der Zellrasen mittels eines Zellschabers abgeschabt. Dann konnte der Flaschenboden mit der Zellsuspension abgespült und in ein 50 ml-Röhrchen überführt werden. Die Zellen wurden danach mit einem Gewebe-Glass-Douncer homogenisiert, damit sich das Virus freisetzt. Es schloss sich ein Zentrifugationsschritt für 15 min bei 3200 g und 4°C an. Der Virusüberstand wurde in Kryoröhrchen aliquotiert und bei -80°C gelagert. Alle Arbeiten wurden auf Eis und mit gekühlten Geräten durchgeführt.

3.2.5. Plaquaufreinigung von Viruspartikeln

Eine Plaquaufreinigung ermöglicht die Isolierung einzelner Synzytien und damit die Generierung von viralen Klonen.

Hierzu wurde eine Virustitration durchgeführt (siehe 3.2.7.1) und nach sechs Tagen einzelne entstandene Plaques mittels einer Pasteurpipette vorsichtig aus dem Agar ausgestanzt. Der Virusplaque wurde dann in 1 ml FCS-freien MEM resuspendiert und anschließend wurden 70% konfluente Zellen einer 6-Napfplatte damit inkubiert. Die Infektion erfolgte für 4 h bei 37°C. Nach Zugabe von 1 ml 5% FCS-haltigem MEM wurde das Virus bis zu drei Tage kultiviert. Es folgte eine Viruspräparation mittels der „Freeze-Thawing“-Technik ohne Zellhomogenisation. Es wurde das gesamte Virusvolumen für eine Neuinfektion verwendet. Hierzu wurden 70-80%ige konfluente Zellen in einer 25 cm² Zellkulturflasche mit jeweils einem Virusklon infiziert und bis zur vollständigen Virusausbreitung (1-3 dpi) bei 37°C inkubiert. Daraufhin erfolgte eine weitere Passagierung mit einem Virusvolumen von 200 µl pro 80% konfluenter Zellen in einer mittleren Zellkulturflasche. Hierzu wurden nach einem Tag die infizierten Zellen 1:2 gesplittet, um eine gute Ausbreitung des Virusklons zu erzielen. Nach einer 3-tägigen Kultivierung bei 33°C und 5% FCS-haltigem MEM erfolgte die Virusernte in 2 ml Volumen pro Zellkulturflasche.

3.2.6. Bestimmung des Virustiter

Die Titerbestimmung ist notwendig, um den Anteil an infektiösen Viruspartikeln einer Präparation bestimmen zu können. Dabei wird nur der Anteil an infektiösen Partikeln analysiert. Der Anteil an defekten, nichtinfektiösen Partikeln kann mit diesen Methoden nicht bestimmt werden.

3.2.6.1. Virustiterbestimmung mittels Plaque-Test

Eine typische CDV- und MV-Infektion von Rezeptor-exprimierende Zellen zeigt die Ausbildung von Plaques im Zellrasen. Bei diesen handelt es sich um Synzytien, multinukleare Zellen, die sich aufgrund von Virus-induzierten Zell-Zell-Fusionen in dem Zellrasen bilden. Diese Plaques werden dann für die Titerbestimmung gezählt. Für die Durchführung wurden am Vortag $1,5 \times 10^5$ Rezeptor-exprimierende Zellen in einer 6-Napfplatte ausgesät und am folgenden Tag mit einer Virusverdünnung infiziert. Hierzu wurde eine Verdünnungsreihe (10^{-1} bis 10^{-7}) des Virus in serumfreiem Medium auf Eis erstellt und auf die Zellen gegeben. Die Virusaufnahme erfolgte bei 37°C für 1 h. Danach wurde das virushaltige Medium von den Zellen abgenommen und die Zellen mit 3 ml 42°C warmer Medium-Agar-Mischung (2% Agar, Doppel-MEM, 5% FCS-haltigem MEM) überschichtet. Dies ist notwendig, damit keine Sekundärinfektion stattfinden kann und sich das Virus nur über Zell-Zellkontakt ausbreiten kann. Nach einer 5-tägigen Inkubation erfolgte eine Neutralrotfärbung (1ml/ Napf) für 1 h. Dies ermöglicht das Anfärben von vitalen Zellen. Die virusinfizierten Plaques bleiben, aufgrund der Schädigung des Lysosoms und des zytopathischen Effekts, ungefärbt. Am folgenden Tag wurde die Anzahl der Plaques pro Verdünnungsstufe ausgezählt und der Virustiter berechnet. Die Titrationen wurden in Triplikaten ausgeführt.

3.2.6.2. Virustiterbestimmung von lentiviralen Partikeln

Der Titer von lentiviralen Partikeln wird mittels einer weiteren Endpunkttitration bestimmt. Hierzu wurden Vero-Zellen in einer 96-Napfplatte mit einer Verdünnungsreihe des lentiviralen Partikels infiziert und anschließend für fünf bis sieben Tage kultiviert. Der Titer wurde bei fluoreszierenden, lentiviralen Partikeln mittels der Fluoreszenzmikroskopie oder mittels spezifischer Antikörperfärbung analysiert. Die Titerauswertung erfolgte mit dem Fluoreszenzmikroskop anhand der Menge an fluoreszierenden Zellen in der jeweiligen Verdünnungsstufe.

3.2.7. Herstellung von pseudotypisierten, lentiviralen Partikeln

Mit Hilfe von lentiviralen Partikel kann eine DNA-Zielsequenz sowohl in ruhende als auch in teilende Zelllinien eingefügt werden. Dafür werden die Zellen mit dem pseudotypisiertem, lentiviralem Vektor transduziert und exprimieren dann die Zielsequenz. In diesem Versuch wurde das 3-Komponentensystem nach Dull et al.

1998, wegen der höheren Biosicherheit im Vergleich zum 2-Komponentensystem, von lentiviralen Partikel angewendet. Als Hüllprotein der Partikel wird das Glykoprotein-G des Vesicular-Stomatitis-Virus (VSV-G) verwendet, welches auf dem Plasmid pVSV-G kodiert ist. Aufgrund des breiten Tropismus von VSV und dessen Rezeptorverbreitung (ein Membranlipid), kann mit dessen Hüllprotein eine Vielzahl an Zellen transduziert werden. Für die Replikation wird das Plasmid pMDLg-/pRRE verwendet. Dieses kodiert für das gag-Gen, das pol-Gen und der „rev responsive element“ (RRE) Sequenz des Humanen-Immundefizienz-Virus 1 (HIV-1). Das zur Transkription notwendig rev-Protein, welches an die RRE-Sequenz bindet, wird durch ein zusätzliches Plasmid, dem pRSVrev, hinzugefügt. Dieses Plasmid enthält den Promotor des Rous-Sarcoma-Virus (RSV) und das rev-Protein von HIV-1.

Für die Herstellung lentiviraler Partikel wurden zuerst 80% konfluente 293T-Zellen in einer 10 cm Schale für 4 h mit 10% FCS-haltigem MEM ohne Antibiotikum kultiviert. Für die Transfektion wurden 60 µl Polyethylenimin-Lösung (PEI) mit 440 µl 150 mM NaCl Lösung vermischt und die, für das 3-Komponentensystem notwendigen Plasmide (pVSV-G 6 µg, pRSVrev 5 µg, pMDLg-/pRRE 10 µg und lentiviraler Vektor 20 µg) mit 150 mM NaCl in einem Gesamtvolumen von 500 µl angesetzt. Dann wurden beide Ansätze vermischt und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Während dieses Schrittes lagert sich das kationische Polymer an die Nukleinsäuren an und ermöglicht in weiteren Schritten die Aufnahmen dieses PEI-Plasmidkomplexes in die Zellen. Hierzu wurde der Transfektionsmix vorsichtig auf die Zellen getropft und über Nacht bei 37°C inkubiert. Nach einer Inkubationszeit von etwa 18-20 h wird ein Mediumwechsel bei den transfizierten Zellen mit 8 ml 10% FCS-haltigem MEM ohne Antibiotikum durchgeführt. Nach zwei bzw. drei Tagen konnten die lentiviralen Partikel geerntet werden.

3.2.8. Einengen lentiviraler Partikel

Das Volumen von lentiviralen Partikeln kann mittels eines Filters auf ein gewünschtes Volumen konzentriert werden. Hierzu wird das gesamte Partikelvolumen auf einen Millipore Filter mit 100`000 MWCO (Amplicon) pipettiert und anschließend mit sterilem PBS auf 15 ml aufgefüllt. Es folgte eine Zentrifugation bei 3000 g für 10 min bei 20°C. Das eingeeengte Partikelvolumen wurde in ein Kryoröhrchen überführt und bei -80°C gelagert.

3.3. Molekularbiologische Methoden

3.3.1. Agarose-Gelelektrophorese

Ein elektrisches Feld ermöglicht die Auftrennung von Desoxyribonukleinsäure (DNA) und Ribonukleinsäure (RNA) auf einem Agarosegel. Dabei wandern kleinere Moleküle schneller durch die Trägermatrix als längere Fragmente. Diese werden der Basenpaar- (bp) bzw. Nukleotidlänge (nt) nach aufgetrennt.

Das Gel setzte sich aus 1%iger Agarose und 1 x TAE Puffer zusammen. Die Lösung wurde gekocht und nach kurzer Abkühlzeit wurde Gelred (1 µl/100 ml) hinzupipettiert. Als DNA-Marker wurde der 1 kb- oder 100 bp-Längenstandard (Fermentas) aufgetragen. Die Proben wurden mit 6x-Auftragspuffer 1:6 vermengt und aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte je nach Agarosegelvolumen (30 – 100 ml) bei einer Spannung von 60-120 kV. Daraufhin konnte das Gel mit dem Programm „Gel IX Imager“ (Intas GDS) unter Ultraviolett (UV)-Licht fotografiert werden.

3.3.2. RNA-Isolation

Die RNA Isolation aus Zellen oder Geweben basiert sowohl für die Verwendung von *TRizol* als auch für *PegGold* auf dem Protokoll von Chomczynski und Sacchi (Chomczynski und Sacchi 1987). Mit dieser sauren Guanidinium-Thiocyanat-Phenol-Chloroform-Extraktion kann RNA sehr effizient und sauber aus einer Probe extrahiert werden. Dabei inhibiert das Guanidinium-Thiocyanat die *RNasen*, das Phenol denaturiert die Proteine und durch Zugabe von Chloroform kommt es zu einer besseren Phasentrennung. Dabei befindet sich die RNA in der wässrigen Phase, die DNA in der Interphase und die Proteine in der festen Phase.

3.3.2.1. TRizol (Invitrogen)

Für die RNA-Isolation mittels *TRizol-Reagent* wurden pro 1×10^6 Zellen, 1 ml *TRizol-Reagenz* verwendet und darin resuspendiert. Die Zell-*TRizol*-Lösung wurde für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert und anschließend mit 0,2 ml Chloroform pro ml *TRizol-Reagenz* homogenisiert. Die Lösung wurde gut gemischt und für 3 min bei Raumtemperatur inkubiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 16000 g für 15 min bei 4°C war die Phasentrennung sichtbar und es konnte die wässrige Phase abgenommen werden. Die RNA-Fällung erfolgte mit 0,5 ml eiskalten Isopropanol pro ml *TRizol-Reagenz* und einem Zentrifugationsschritt von 16000 g für 10 min bei 4°C. Das RNA-Pellet wurde dann mit 1 ml 75%igem Ethanol gewaschen und bei 16000 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert. Dieser Schritt wurde, um eine reinere RNA-Probe zu erhalten, zweimal wiederholt. Das RNA-Sediment wurde dann luftgetrocknet und in einem bestimmten Volumen von RNase-freiem H₂O gelöst. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.3.2.2. PegGold RNAPure (peqlab)

Für die RNA-Isolation mittels PegGold wurden $5-10 \times 10^6$ Zellen verwendet und diese sedimentiert. Das Zellsediment wurde mit 1 ml Gebrauchslösung resuspendiert und für 5 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde pro ml Gebrauchslösung 0,2 ml Chloroform zugegeben und für 15 sek gut gemischt. Nach einer Inkubationszeit von 10 min bei Raumtemperatur erfolgte ein Zentrifugationsschritt bei 16000 g für 5 min bei Raumtemperatur. Die Phasentrennung in wässrige Phase, Interphase und Phenol-Chloroform-Phase war zu erkennen und die RNA-haltige, wässrige Phase wurde vorsichtig in ein neues Gefäß überführt. Durch Zugabe von 0,5 ml eiskalten Isopropanol und einer Inkubation für 15 min bei Raumtemperatur wurde die RNA präzipitiert. Das RNA-Sediment wurde, nach einer Zentrifugation bei 16000 g für 10 min bei 4°C, zweimal mit 1 ml eiskalten 75%igen Ethanol gewaschen. Hierzu wurde jeweils für 5 min bei 16000 g zentrifugiert. Abschließend konnte das RNA-Sediment luftgetrocknet und in einem geeigneten Volumen an RNase-freiem H₂O gelöst werden. Die Lagerung erfolgte bei -80°C.

3.3.3. DNA- und RNA-Konzentrationsbestimmung

Die Konzentration von DNA- und RNA-Proben kann mittels der optischen Dichte bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt werden. Die Verunreinigungen mit Proteinen werden bei einer Wellenlänge von 280 nm gemessen. Hohe Extinktionen bei einer Wellenlänge von 230 nm lassen auf Kontaminationen mit organischen Substanzen schließen. Mit dem Verhältnis von 260/280 nm und 260/230 nm kann die Reinheit der Proben bestimmt werden. Für DNA-Proben sollte der 260/280 nm Wert bei 1,8 liegen und für RNA ist ein Wert von 2 für beide Quotienten akzeptabel.

Für die Analyse von DNA- oder RNA-Proben wurden je 1 µl Probe mit dem Spektrophotometer Nanodrop-2000 gemessen. Die Auswertung zeigte die Konzentration und die Reinheit der Proben, sowie den Kurvenverlauf der Probe von Wellenlänge 220 nm bis 340 nm.

3.3.4. Reverse Transkription

Eine RNA-abhängige-DNA-Polymerase katalysiert das Umschreiben einer einzelsträngigen RNA-Sequenz in eine einzelsträngige DNA-Sequenz. Die RNA in dem entstandenen RNA-DNA-Hybrid wird durch das Enzym *RNase H* verdaut, so dass am Ende der Reaktion eine einzelsträngige DNA-Sequenz (cDNA) entstanden ist. Mit Hilfe einer DNA-abhängigen-DNA-Polymerase wird diese in ein doppelsträngiges DNA-Fragment konvertiert.

Die Herstellung einer cDNA aus einer RNA-Probe wurde mittels des Enzyms *M-MLV-reverse-Transcriptase* (RT, Promega) durchgeführt. Hierzu wurde zuerst der RNA-Primer-dNTP-Mix für 5 min bei 70°C inkubiert und für 2 min auf Eis abgekühlt. Nach der Zugabe des RT-Puffers wurde das Gemisch bei 42°C für 2 min inkubiert und es folgte die Zugabe des Enzyms (Tab. 1). Die reverse Transkription verlief bei 42°C für

50 min. Es folgte ein Inaktivierungsschritt bei 70°C für 15 min und eine anschließende Kühlung bei 4°C. Die entstandene cDNA wurde bei -20°C gelagert.

Tabelle 1: Pipettierschema für die Reverse Transkription

Reagenz	Menge
RNA-Probe	2 µg
Primer Oligo-dT ₁₈ (0,5 µg / µl, Fermentas) oder random Primer (500 µg/ml, Promega)	1 µl
dNTPs (40 mM, Promega)	1,25 µl
H ₂ O HPLC	auf 19 µl auffüllen
5x M-MLV RT-Puffer (Promega)	5 µl
M-MLV reverse Transkriptase (200 U, Promega)	1 µl
Gesamtvolumen	25 µl

3.3.5. Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Eine DNA-abhängige-DNA-Polymerase ermöglicht die exponentielle Amplifikation eines DNA-Fragmentes mit bestimmten Primer. Unter bestimmten Temperaturbedingungen wird zuerst die doppelsträngige DNA denaturiert, damit die Primer hybridisieren können. Es folgt eine Elongationsphase, abhängig von der Fragmentlänge, bevor ein neuer Amplifikationszyklus beginnt. Die Temperaturen und Zeitintervalle des PCR-Prozesses wurden abhängig von der verwendeten Polymerase und Primern individuell erstellt.

3.3.5.1. PCR-Ansatz mit PuRe-Taq-Ready-To-Go-PCR-Beads

Die Reaktion wurde nach Protokoll (GE Healthcare) durchgeführt und das Pipettierschema wie folgt verwendet (Tab. 2).

Tabelle 2: PCR-Ansatz mit PuRe-Taq Ready-To-Go-PCR-Beads

Reagenz	Menge
PuRE-Taq-Ready-To-Go-PCR-Beads (Illumina)	1 Stück
H ₂ O	21 µl
Primer vorwärts (10 mM)	1 µl
Primer rückwärts (10 mM)	1 µl
DNA-Probe	2 µl
Gesamtvolumen	25 µl

3.3.5.2. PCR-Ansatz mit Taq-DNA-Polymerase

Die Polymerase-Kettenreaktion zur Amplifikation spezifischer DNA-Fragmente wurde mit der *Taq-DNA-Polymerase* (Fermentas) und spezifischen Primern (Sigma Aldrich) durchgeführt. Das Pipettierschema ist in Tabelle 3 angegeben und wurde mit dem, für die eingesetzten Primern, optimalen Protokoll amplifiziert.

Tabelle 3: PCR-Ansatz mit *Taq-DNA-Polymerase*

Reagenzien	Mengen
Probe	2 μ l
Primer vorwärts (10 mM)	1 μ l
Primer rückwärts (10 mM)	1 μ l
10x Taq-Puffer +KCl –MgCl ₂ (Fermentas)	2,5 μ l
25 mM MgCl ₂	2,5 μ l
10 mM dNTPs	0,5 μ l
<i>Taq-DNA-Polymerase</i> (rekombinant, 1U/ μ l, Fermentas)	0,5 μ l
H ₂ O	15 μ l
Gesamtvolumen	25 μ l

3.3.5.3. PCR mit *Phusion-Polymerase*

Die Fehlerrate der *Phusion-Green-Hot-StartII-High-Fidelity-DNA-Polymerase* (Thermo Scientific) liegt bei 10^{-7} . Diese Polymerase wurde verwendet, um den Einbau von beliebigen Mutationen während der PCR, aufgrund der hohen Zyklenzahl, zu vermeiden. Das Pipettierschema für diese Polymerase ist in Tabelle 4 wiedergegeben.

Tabelle 4: PCR-Ansatz mit *Phusion-Green-Hot-StartII-High-Fidelity-DNA-Polymerase*

Reagenzien	Mengen
Probe	2 μ l
Primer vorwärts (10 mM)	1 μ l
Primer rückwärts (10 mM)	1 μ l
5 x Phusion-Green-HF-Puffer (Thermo Scientific)	5 μ l
10 mM dNTPs	0,5 μ l
<i>Phusion-Gree-Hot-StartII-High-Fidelity-DNA-Polymerase</i> (2 U/ μ l, Thermo Scientific)	0,25 μ l
H ₂ O	15,25 μ l
Gesamtvolumen	20 μ l

3.3.6. Restriktionsendonuklease Verdau

Anhand von Restriktionsenzymen kann eine Plasmid-DNA in gewünschte Fragmente geschnitten werden. Hierzu werden Restriktionsenzyme gewählt, welche die DNA an einer palindromischen Stelle schneiden. Die geschnittene DNA ist anschließend linearisiert und kann, je nach verwendetem Enzym, sowohl glatte Enden, als auch überhängende Enden besitzen.

Für einen analytischen Verdau wurde ein Ansatzvolumen von 20 μ l und 1 μ g Plasmid verwendet, welcher für 1 h bei 37°C inkubiert wurde. Ein präparativer Verdau mit einem Volumen von 100 μ l und 15 μ g Plasmidmenge wurde bei 37°C für 3 h inkubiert (Tab. 5). Die Inaktivierung und Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tabelle 5: Ansatz für den enzymatischen Verdau

Reagenzien	Für den analytischen Verdau	Für den präparativen Verdau
Plasmid	1 µg	15 µg
Enzym	10 U	50 U
10 x Puffer	2 µl	2 µl
H ₂ O	auf 20 µl auffüllen	auf 100 µl auffüllen
Gesamtvolumen	20 µl	100 µl

3.3.7. *Klenow-Fragment*

Das *Klenow*-Enzym besitzt sowohl eine Polymerasefunktion als auch eine Exonukleasefunktion. Dadurch können sowohl 5'-überstehende, einzelsträngige DNA-Fragmente aufgefüllt und 3'-überstehende, einzelsträngige DNA-Fragmente abgebaut werden. Es resultieren daraus „blund-end“-Fragmente.

Der Reaktionsansatz (Tab. 6) wurde für 30 min bei 37°C inkubiert und dann bei 72°C für 10 min inaktiviert. Die Lagerung erfolgte bei -20°C.

Tabelle 6: Pipettierschema für *Klenow-Fragment* Behandlung

Reagenzien	Menge
DNA-Fragment	7,5 µg
<i>Klenow-Fragment</i> (10 U/µl, Fermentas)	1 µl
10 x <i>Klenow-Puffer</i> (Fermentas)	5 µl
10 mM dNTPs	0,5 µl
H ₂ O	auf 50 µl auffüllen
Gesamtvolumen	50 µl

3.3.8. DNA-Dephosphorylierung

Das Enzym *Calf-Intestine-Alkaline-Phosphatase* (CIAP, Fermentas) katalysiert die Hydrolyse freier Phosphatgruppen von DNA- und RNA-Fragmenten. Dadurch wird bei Ligationen, durch das Fehlen der 5'-Phosphatgruppe des linearisierten Vektors, eine Selbstligation verhindert.

Das Dephosphorylierungsprotokoll ist in Tabelle 7 wiedergegeben. Der Ansatz wurde für 1 h bei 37°C inkubiert und anschließend bei 72°C für 10 min inaktiviert.

Tabelle 7: Pipettierschema für die DNA-Phosphorylierung

Reagenzien	Mengen
Linearisiertes Fragment	2 µg
10 x CIAP-Puffer (Fermentas)	5 µl
CIAP-Enzym (1 U/ µl, Fermentas)	2 µl
H ₂ O	auf 50 µl auffüllen
Gesamtvolumen	50 µl

3.3.9. Ligation

Die Ligation bewirkt die kovalente Bindung eines linearisierter Vektors mit einen gewünschten DNA-Fragment. Sowohl der Vektor, als auch das einzufügende Fragment, müssen komplementäre Schnittstellen enthalten, damit das Enzyms *T4-DNA-Ligase* (Fermentas) die 3'-Hydroxy-Ende mit dem 5'-Phosphat-Ende durch Ausbildung einer Phosphodiesterbindung miteinander verbinden kann. Dadurch erhält man ein neues, zirkuläres Vektorkonstrukt mit der gewünschten Zielsequenz. Der Ligationsansatz (Tab. 8) wurde auf Eis in verschiedenen Verhältnissen von einzufügendem Konstrukt zu Vektor pipettiert, für 1 h bei Raumtemperatur inkubiert und dann bei -20°C gelagert.

Tabelle 8: T4-DNA-Ligationsansatz

Reagenzien	Mengen
Einzufügendes Fragment : Vektor in ng	3:1 oder 5:1
<i>T4-DNA-Ligase</i> (Fermentas)	1 µl
10 x T4-DNA-Ligase-Puffer (Fermentas)	2 µl
H ₂ O	auf 20 µl auffüllen
Gesamtvolumen	20 µl

Die Berechnung der einzusetzenden Menge an einzufügendem Fragment (Insert) wird mittels folgender Formel berechnet:

3.3.10. Mykoplasmentest

Die Kontamination einer Zelllinie mit Mykoplasmen wurde mit dem „Venor Gem Mycoplasma Detection Kit for conventional PCR“ (Minerva Biolabs) nach dem Standardprotokoll durchgeführt. Für die PCR wurde die *Taq-DNA-Polymerase* (Fermentas) verwendet und anschließend die PCR-Produkte mit einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt.

3.3.11. Sequenzierung

Die Sequenzierung eines DNA-Fragmentes wurde mit dem „Big Dye Terminator v 3.1 Sequencing Kit“ (BDT, Life Technologies) durchgeführt. Hierzu erfolgte die Sequenzierung nach der Kettenabbruchsynthese nach Sanger, bei der fluoreszierende Nukleotide in die Sequenz eingebaut werden (Sanger et al. 1977). Für die Sequenzierung wurden 0,2 ml Röhrchen verwendet und die Reaktion nach Protokoll (Tab. 9) auf Eis pipettiert. Die Reaktion wurde nach Protokoll (Tab. 10) im Thermocycler durchgeführt. Die Sequenzierung erfolgte mit dem „ABI Prism 310 Genetic Analyser“ am institutseigenen Sequenzierung durch die Virusdiagnostik.

Tabelle 9: Sequenzierungsprotokoll

Reagenzien	Mengen
Probe	2 µl
Primer (10 mM)	1 µl
5x BDT-Puffer (Life Technologies)	1 µl
BDT-Enzym-Mix (Life Technologies)	1 µl
Gesamtvolumen	5 µl

Tabelle 10: Sequenzierungsprogramm mit 25 Zyklen

Temperatur	Zeit
96°C	30 sek
50°C	15 sek
60°C	4 min

3.3.12. DNA-Gelextraktion

Die Isolierung eines bestimmten DNA-Fragmentes wurde mit dem „Qiagen-Gelextraktion-Kit“ nach Protokoll durchgeführt. Um eine saubere Probe in geringem Eluationsvolumen zu erhalten, wurden die Probensäule, wie angewiesen, mit 750 µl PE-Puffer für 5 min inkubiert, gewaschen und abschließend in 30 µl H₂O_{HPLC} eluiert.

3.4. Mikrobiologische Methoden

3.4.1. Herstellung thermokompetenter Bakterien

Für die Herstellung thermokompetenter Bakterien wurde die Rubidiumchlorid-Methode verwendet (Hanahan 1983). Hierzu wurde 1 ml eine Über-Nacht-Kultur an Bakterien in 500 ml LB-Medium überführt. Die Bakterien wurden dann im 37°C-Schüttler bis zu einer optischen Dichte (OD) von 0,4 - 0,7 inkubiert. Anschließend wurden die Bakteriensuspension für 15 min bei 3000 g und 4°C zentrifugiert und das Sediment in 150 ml TFB-I-Puffer resuspendiert. Es folgte eine Inkubation für 15 min auf Eis. Erneut wurden die Bakterien zentrifugiert und das Sediment mit 20 ml TFB-II-Puffer resuspendiert. Abschließend konnten die Bakterien aliquotiert und bei -80°C gelagert werden.

3.4.2. Transformation thermokompetenter Bakterien

Die Transformation thermokompetenter Bakterien ermöglicht die Aufnahme von Fremd-DNA in Bakterien. Zuerst werden in der Bakterienwand chemische Poren gebildet. Diese werden mittels eines kurzen Hitzeschocks durchlässig gemacht und die Fremd-DNA kann in die Bakterien aufgenommen werden.

Für die Hitzeschocktransformation wurden 50 µl kompetente *E.coli XL-10 Gold* Zellen mit 1 µl Plasmid für 30 min auf Eis inkubiert. Der Hitzeschock erfolgt für 2 min bei 42°C im Heizblock. Die transformierte Bakteriensuspension wurde dann für 5 min auf

Eis inkubiert, damit sich die geöffneten Poren wieder schließen können. Diese Suspension wurde in 900 µl LB-Medium überführt und bei 37°C für 1 h im Schüttler inkubiert. Ein Teil der Lösung wurde auf antibiotikahaltige Agarplatten ausplattiert und über Nacht im 37°C Brutschrank inkubiert.

3.4.3. Vor- und Hauptkultur von Bakterien

Eine Vorkultur einer transformierten Bakterienkolonie dient zur ersten Anreicherung und Kultivierung der Bakterien. Zur Expansion des transformierten DNA-Plasmids dient dann die Hauptkultur.

Dafür wurde jeweils eine Bakterienkolonie in 5 ml LB-Medium resuspendiert und für 4 h im 37°C warmen Schüttler inkubiert. Daraufhin konnte dann ein Teil der Vorkultur in ein größeres LB-Volumen überführt werden. Hierzu wurde für eine Plasmid-Minipräparation ein antibiotikahaltiges LB-Mediumvolumen von 5 ml und für eine Plasmid-Maxipräparation ein antibiotikahaltiges LB-Mediumvolumen von 100 ml verwendet. Die Bakteriensuspension wurde über Nacht im 37°C warmen Schüttler inkubiert.

3.4.4. Plasmidpräparation

3.4.4.1. Minipräparation

Die Plasmid-Minipräparation, aus einer über Nacht kultivierten 5 ml Bakterienkultur, erfolgte mit dem Kit „Qiagen miniPrep Kit“ nach Standardprotokoll. Das isolierte Plasmid wurde in 50 µl H₂O eluiert.

3.4.4.2. Maxipräparation

Die Plasmid-Maxipräparation einer 100 ml Bakterienkultur ermöglicht die Isolierung großer Mengen eines Plasmidkonstruktes aus einer Bakterienkultur. Eine Übernachtkultur von 100 ml antibiotikahaltigem LB-Medium wurde dazu verwendet. Die Isolierung des Plasmids wurde mit dem Kit „Qiagen Plasmid Maxi Kit“ nach Standardprotokoll durchgeführt.

3.4.5. Glycerinkultur

Glycerinkulturen dienen dazu, längerfristig transformierte Bakterienkolonien zu lagern und diese sofort wieder kultivieren zu können, ohne eine erneute Transformation des entsprechenden Plasmids durchführen zu müssen. Hierzu wurden je 200 µl Bakterienkultur 1:1 mit Glycerin vermischt und anschließend bei -80°C gelagert.

3.5. Immunhistochemische Methoden

3.5.1. Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (Fluorescence activated cell sorting, FACS) dient zum Nachweis von extrazellulären und intrazellulären Proteinen einer Zelle. Mit Hilfe von Fluoreszenz-gekoppelten Antikörpern kann die Expression bestimmter Proteine lokalisiert und bewertet werden. Die Struktur und Größe der Zellen kann ebenso analysiert werden.

3.5.1.1. Durchflusszytometrie

Diese Färbung dient dazu, spezifische Rezeptoren an der Oberfläche von lebenden Zellen zu detektieren. Für diesen Versuch wurden 2×10^5 Zellen in ein Röhrchen überführt und mit 2 ml FACS-Puffer gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei 300 g). Die Zellen wurden, je nach Versuchsansatz mit 4%iger Paraformaldehyd-Lösung (PFA) für 10 min bei 4°C fixiert oder nicht fixiert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen und in 5%iger Bovines-Serum-Albumin-Lösung (BSA) für 20 min inkubiert. Nach einem Waschschrift erfolgte die Färbung mit dem 1. Antikörper für 1 h bei Raumtemperatur. Der 2. Antikörper wurde, nach einem wiederholten Waschschrift, ebenfalls 1 h inkubiert. Nach einem abschließenden Waschschrift mit FACS-Puffer konnten die Proben im FACS-Gerät analysiert und mit dessen Programm ausgewertet werden.

3.5.1.2. Zellsortierung

Die Sortierung von Zellen ermöglicht die Analyse und Aufbereitung bestimmter Zelltypen. Hierzu wurden 1×10^6 Zellen mit einem bestimmten Antikörper behandelt, auf dessen Epitoperkennung die Sortierung stattfinden soll. Zuerst wurden die Zellen mit 4% BSA-Lösung gewaschen und für 5 min bei 300 g zentrifugiert. Die Antikörperinkubation für einen bestimmten Oberflächenrezeptor fand für 1 h bei 4°C statt. Dann wurde der 1. Antikörper mittels eines Waschschriftes mit 4%iger BSA-Lösung entfernt und der 2. Antikörper wiederum für 1 h inkubiert.

Der ungebundene 2. Antikörper wurde ebenfalls durch einen Waschschrift entfernt und die Zellen für den Sortierungsprozess in 1 ml 5% FCS-haltigen MEM mit doppelter Antibiotikamenge resuspendiert. Die Zellen wurden über ein 5 ml Polystyrol-Röhrchen mit Filter (BD Falcon) pipettiert und der Durchfluss anschließend sortiert. Nach der Selektion wurden die Rezeptor-exprimierenden Zellen in 1 ml 5% FCS-haltigem MEM mit doppelter Antibiotikamenge weiterkultiviert.

3.5.1.3. Bestimmung der zellulären Proliferationsrate

Das CFSE (Carboxyfluorescein-Diacetat-N-Hydroxysuccinimidyl-Ester) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der es ermöglicht die Teilungsrate von Zellen zu bestimmen. Dabei wird das CFSE in die lebenden Zellen aufgenommen und dieses bindet über die Succinimidylgruppe an intrazelluläre freie Amine. Die intrazellulären *Esterasen* schneiden die Acetatgruppe und setzen damit das Grün-fluoreszierende Carboxyfluorescein frei.

Für diesen Versuch wurden 2×10^5 Zellen in 2 ml PBS und 0,5 μ l CFSE-Lösung (5 mMol) für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde kaltes PBS zugegeben und die Zellen für 5 min bei 300 g zentrifugiert, um überschüssiges CFSE-Substrat zu entfernen. Dieser Waschschrift wurde zweimal wiederholt. Das Zellsediment wurde in Medium resuspendiert und für vier Tage im Brutschrank inkubiert. Als Kontrolle dienten CFSE-markierte Zellen, die mit 4%iger PFA-Lösung fixiert wurden, und damit keine Zellteilung mehr aufweisen. Die Proliferationsrate wurde anhand der Durchflusszytometrie bestimmt.

3.5.2. Immunfluoreszenzfärbung für die Fluoreszenzmikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Objektträger mit vier bzw. acht aufgesetzten Kammern verwendet. Hierzu wurde das Medium von den Zellen abgenommen, einmal mit sterilem PBS gewaschen. Anschließend wurden die Zellen durch Zugabe von 4%iger PFA-Lösung bei Raumtemperatur für 20 min fixiert. Für eine intrazelluläre Färbung erfolgte die Permeabilisierung der Zellen für 10 min bei 4°C mit einer 0,1%igen TritonX-Lösung. Nach einem dreimaligen Waschschrift mit PBS wurde eine unspezifische Antikörperbindung mit 5% BSA-Lösung für 20 min bei Raumtemperatur verhindert. Die Inkubation des ersten Antikörpers erfolgte für 1 h bei Raumtemperatur und nach einem Waschschrift mit PBS erfolgte die Inkubation mit dem zweiten Antikörper, wiederum für 1 h bei Raumtemperatur. Abschließend wurden die Zellen dreimal mit PBS gewaschen, bevor sie mit Moviol und einem Deckglas für die Mikroskopie überschichtet wurden.

3.5.3. Antikörperspezifische Hemmung von Rezeptorepitopen

Die spezifische Rezeptorbindung eines Virus kann mittels eines Antikörper-Inhibitionstests analysiert werden. Hierzu wird ein rezeptorspezifischer monoklonaler Antikörper verwendet, der das Epitop für die Virus-Rezeptorbindung erkennt und dadurch die rezeptorspezifische Infektion blockiert.

Für diesen Test wurde 70-80% konfluente Zellen für 3 h mit spezifischen Antikörpern (Maus anti-human Nectin4, oder anti-human CD150) und entsprechenden Isotypkontrollantikörpern (IgG1 κ) in unterschiedlichen Konzentrationen (0 - 10 μ g/ml) in FCS-freiem Medium inkubiert. Anschließend erfolgte direkt die Virusinfektion mit einer MOI von 0,1. Nach einer Inkubation für 3 h bei 37°C wurde das Medium gewechselt und die Zellen im Brutschrank inkubiert. Die Analyse erfolgte mittels Fluoreszenzmikroskop an unterschiedlichen Zeitpunkten.

3.6. Software und Auswertungsprogramme

3.6.1. Primerdesign

Für die Bestimmung von spezifischen Primern wurde das Programm „Primerselect“ (DNASar) verwendet. Wichtige Kriterien für die Primerwahl sind die Primerlänge, die hohe Bindespezifität, die Schmelztemperatur, die Vermeidung von Primerdimeren und Haarnadelstrukturen, sowie die Vermeidung von wiederholten Sequenzabschnitten und ein niedriger G/C-Gehalt. Die Synthetisierung erfolgte bei der Firma Sigma Aldrich.

3.6.2. Sequenzierung

Die Sequenzierung wurde von der hausinternen Diagnostik durchgeführt. Die Auswertung und das Sequenzalignment erfolgte mit den Programmen „MegAlign“ von (DNASar) sowie dem „GeneDoc“ Programm.

3.6.3. Plasmidkarten

Für die Erstellung von Plasmidkarten und der Analyse von bestimmten Schnittstellen wurde das Programm „SeqBuilder“ (DNASar) verwendet.

3.6.4. Photobearbeitung

Die Bearbeitung und Überlagerung von verschiedenen Bildaufnahmen wurde das Programm „Photoshop CS3“ verwendet.

3.6.5. Strukturmodelle

Die Strukturmodelle wurden mit dem Programm „Phyre2“ und dem Proteinstrukturvorhersageprogramm „3DLigandSite“ (Imperial College, London) durchgeführt (Kelley und Sternberg 2009, Wass et al. 2010).

3.6.6. Auswertungen mit Tabellen und Graphen

Für die Auswertung der Titrationsen und der Erstellung von Graphiken wurde das Programm „Microsoft Office Excel 2007“ verwendet.

4. Ergebnisse

4.1. Adaptierung von rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red an humanes Nectin4

Zu Beginn dieser Arbeit war bekannt, dass das Masernvirus (MV) die humane Epithelzelllinie H358 Rezeptor-vermittelt infizieren kann, wobei der epitheliale Rezeptor (EpR) jedoch noch nicht identifiziert war (Takeda et al. 2007). Die ersten Versuche der Adaptierung von wildtypischen Hundestaupevirus (CDV) wurde deswegen zunächst mit der humanen Epithelzelllinie H358 durchgeführt (Han J. W. 2010). Erst im Verlauf dieser Arbeit wurde bekannt, dass das MV und das CDV Epithelzelllinien mittels des Rezeptors Nectin4 infizieren können (N4, Mühlebach et al. 2011, Noyce et al. 2011, Noyce et al. 2013). In den folgenden Experimenten sollte die Frage geklärt werden, ob und welche Mutationen im CDV für eine Bindung an den humanen Rezeptoren Nectin4 benötigt werden.

4.1.1. Oberflächenexpression von Nectin4 auf H358-Zellen

In den Arbeiten von Mühlebach, Noyce (Mühlebach et al. 2011, Noyce et al. 2011) und von mir wurde die Oberflächenexpression von Nectin4 mit Hilfe der Immunfluoreszenz und der Durchflusszytometrie verifiziert. Für die Durchflusszytometrie wurden H358-Zellen mit dem murinen monoklonalen humanen Nectin4-Antikörper (MAB2658, R&D Systems, 5 ng/ul) und einem sekundären Fluorescein-Isothiocyante (FITC)-gekoppelten anti-Maus Antikörper (Dako A/S, 27 ng/μl) gefärbt, um die Oberflächenexpression zu detektieren (siehe 3.5.1.1). Für die Immunfluoreszenz im UV-Mikroskop wurden die Zellen in einer 8er-Kammer ausgesät, fixiert und mit MAB2658-Antikörper (5 ng/μl) und dem sekundären Alexa-Fluor-488 anti-Maus IgG (Invitrogen, 10 ng/μl) markiert (siehe 3.5.2.). Die Auswertung der Oberflächenexpression ergab ein spezifisches Signal für die Nectin4-Antikörpermarkierung und zeigt eine homogene Population, positiv für das Nectin4 (Abb. 14 A, gepunktete Linie). Als Kontrolle wurde die Zelllinie H358 nur mit dem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper markiert (H358, schwarze Linie). Dies ermöglicht den Ausschluss von unspezifischen FITC-Signalen in der Durchflusszytometrie und wird als Negativkontrolle verwendet. Auch die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen zeigen ein deutliches Grünfluoreszenzsignal und damit eine gute Expression des Nectin4 auf den H358-Zellen (Abb. 14 B).

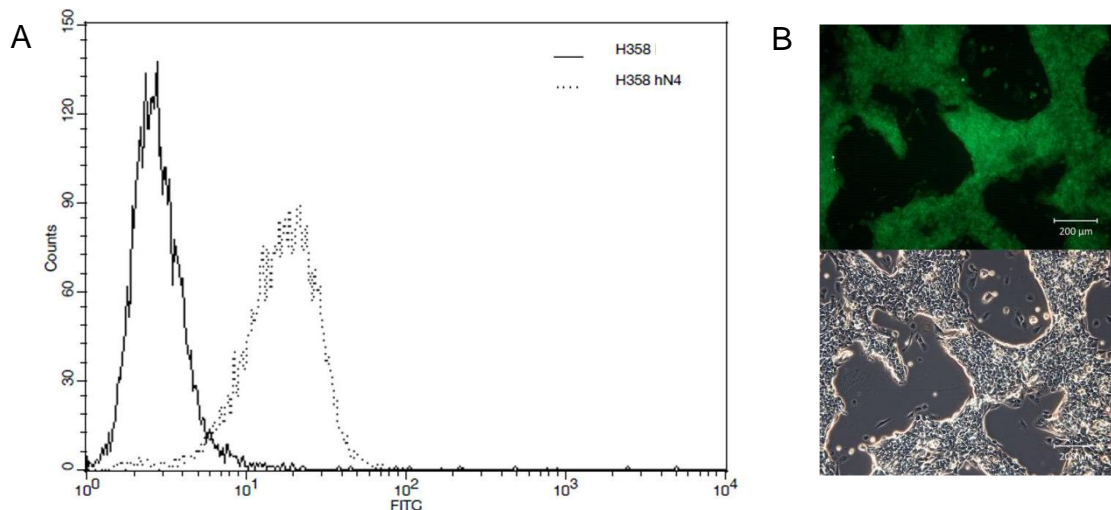


Abbildung 14: Expression von Nectin4 auf H358-Zellen

Die Zelloberfläche der H358-Zellen wurde mit murinen monoklonalem humanem Nectin4 Antikörper (MAB2658, R&D Systems) und sekundär mit FITC-konjugiertem anti-Maus Antikörper gefärbt und in der Durchflusszytometrie analysiert. Als Negativkontrolle wurden H358-Zellen mit Sekundärantikörper markiert (Linie). Die Immunfluoreszenzfärbung der Zelllinie mit MAB2658-Antikörper und sekundärem Alexa-Fluor-488 anti-Maus Antikörper (Invitrogen) wurde im Fluoreszenzmikroskop aufgenommen (B, Balken = 200 µm).

In Abbildung 15 wurde die Zelllinie H358 mit dem rekombinanten MV-IC323eGFP mit einer MOI von 0,01 infiziert (siehe 3.2.2.1.). Dieses Virus kodiert zusätzlich für ein Grün-fluoreszierendes Protein (eGFP) und kann dadurch im Fluoreszenzmikroskop detektiert werden. Nach fünf Tagen ist eine deutliche Synzytienbildung, sowohl in der fluoreszenzmikroskopischen Aufnahme als auch in der Hellfeldaufnahme zu erkennen (Abb. 15).

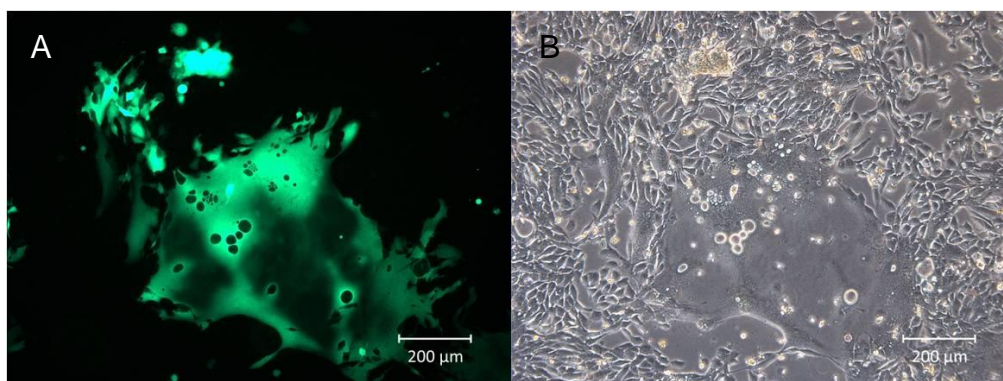


Abbildung 15: Infektion der humanen Epithelzelllinie H358 mit MV-IC323eGFP

Die humane Epithelzelllinie H358, welche den epithelialen Rezeptor Nectin4 exprimiert, wurde mit dem MV-IC323eGFP mit einer MOI von 0,01 infiziert. Die Fotomikroskopische Aufnahme der Fluoreszenz des eGFP-exprimierenden Virus wurden nach fünf Tagen unter UV-Licht fotografiert (A, B: Hellfeldaufnahme, Balken = 200 µm).

4.1.2. Hemmung der CDV-Infektion von H358-Zellen mit humanen Nectin4 Antikörper

In der Diplomarbeit von Jung Woo Han konnte gezeigt werden, dass das CDV-A75/17red H358-Zellen infizieren kann und sich innerhalb weniger Passagen weiter anpasst (Abb. 11; Han J. W. 2010, Bieringer et al. 2013). Bis dato war nicht bekannt, über welchen Rezeptor die Morbilliviren diese Epithelzellen infizieren können. Die Entdeckung des Nectin4 als Morbillivirusrezeptor auf Epithelzellen lässt die Vermutung zu, dass sich das CDV-A75/17red, während der Passagierung auf H358-Zellen, an das Nectin4 adaptiert hat. Um dies zu verifizieren, und um einen möglichen weiteren Epithelrezeptor ausschließen zu können, wurden H358-Zellen mit einem Nectin4-Antikörper behandelt, der die Virus-Rezeptor-Interaktion blockieren soll. Anschließend wurden die behandelten Zellen mit CDV infiziert, um die Infektionseffizienz von CDV auf diesen Zellen untersuchen zu können. Dazu wurden die H358-Zellen vor der Infektion mit CDV-H358 mit verschiedenen Konzentrationen (0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml, 10 µg/ml) an MAB2658-Antikörper und Antikörper-Isotypkontrolle IgG1κ (Klon MOPC-31C; BD Pharmingen) behandelt (siehe 3.5.3.). Es folgte eine Infektion mit CDV-H358 (3. Passage), mit einer MOI von 0,1, ohne den jeweiligen Antikörper zu entfernen. Fluoreszenzmikroskopische Auswertungen nach fünf Tagen zeigten, dass mit zunehmender Nectin4-Antikörperkonzentration der Anteil Rot-fluoreszierender Zellen abnimmt (Abb. 16 A). Die Isotypkontrolle (IgG1κ) zeigte unter gleichen Bedingungen keinen Unterschied (Abb. 16 B).

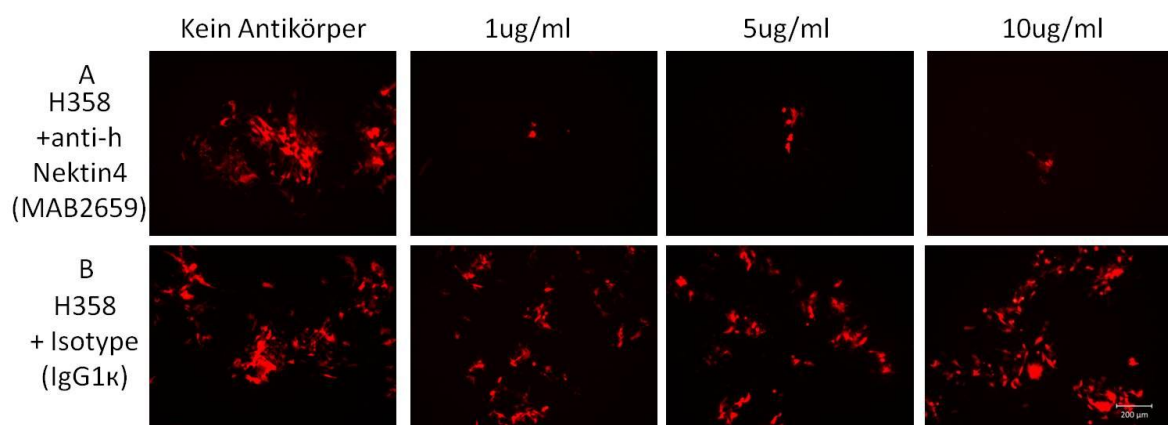


Abbildung 16: Hemmung der CDV-Infektion von H358-Zellen mit humanen Nectin4 Antikörper

Die H358-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von spezifischem, murinem, monoklonalem, humanem Nectin4 Antikörper (A, MAB2658; R&D Systems) und isotypischem Antikörper (B, Klon MOPC-31C; BD Pharmingen) behandelt. Anschließend wurden die Zellen mit CDV-H358 (3. Passage) mit einer MOI von 0,1 infiziert (A). Bilder der Fluoreszenz des tdTomato-Rot-exprimierenden Virus wurden unter UV-Licht nach fünf Tagen im Mikroskop aufgenommen (Balken = 200 µm).

4.1.3. Sequenzanalyse des CDV-H358

Die Adaptierung des rekombinanten, wildtypischen CDV-A75/17red an die humane Epithelzelllinie H358 kann mit einer Anpassung des viralen Genoms und der viralen Proteine an die neuen Infektionsbedingungen einhergehen. Deswegen wurde das gesamte Genom des CDV-H358 in der vierten Passage sequenziert und nach Mutationen untersucht. Für diese Analysen wurden H358-Zellen mit dem Virus mit einer MOI von 0,1 infiziert und für vier Tage inkubiert (siehe 3.2.3.). Die RNA wurde mit PegGold aus den Zellen isoliert und die Konzentration mit dem Spektrophotometer bestimmt (siehe 3.3.2.2. und 3.3.3.). Das virale einzelsträngige RNA Genom in Negativorientierung wurde mittels reverser Transkriptase (*M-MLV-reverse Transkriptase*) und random-Primern in cDNA umgeschrieben und mit spezifischen CDV-Primern abschnittsweise mit einer *Taq-Polymerase* amplifiziert (siehe 3.3.4 und 3.3.5.2.). Die resultierenden Genomabschnitte wurden dabei so gewählt, dass diese überlappend das gesamte CDV-Genom abdecken (siehe 6.1.). Damit können sowohl die kodierenden Bereiche, als auch die nichtkodierenden Bereiche des Virusgenoms analysiert werden. Die spezifischen viralen PCR-Produkte wurden anschließend mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt und die Fragmente mittels „QIA quick® Gelextraktion Kit“ (Qiagen) aufgereinigt (siehe 3.3.1. und 3.3.12). Es folgte die Sequenzierung der Fragmente mit dem „Big Dye Terminator 3.1 Cycle Sequencing Kit“ und CDV-A75/17 spezifischen Primern, welche anhand der Datenbanksequenz AF 164.967.1 bestimmt wurden (siehe 3.3.11. und 6.1, www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF164967.1). Um eine komplette Abdeckung des viralen Genoms zu erreichen, wurden die Sequenzierungsprimer im Abstand von etwa 400 bp gewählt, so dass sich die Sequenzen in der Auswertung überlagern. Die Daten konnten anschließend mit dem Programm „MegAlign“ und „Genedoc“ ausgewertet werden. Als Referenzsequenz wurde die CDV-A75/17-Sequenz aus der NCBI-Datenbank (www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AF164967.1) zugrunde gelegt. Ebenso wurde der parentalen CDV-A75/17red, der auf Vero-cSLAM-Zellen gezüchtet wird, sequenziert. In der kodierenden Domäne des F-Gens ist eine Mutation bei Nukleotid 5366 von Thymin (T) zu Cytosin (C) vorhanden, jedoch hat diese keine Änderung der Aminosäuresequenz zu Folge. Auch im H-Gen ist bei Nukleotid 7276 eine Adenosin (A) zu Guanosin (G) Veränderung vorhanden (Tab. 11). Diese stellt ebenso eine stille Mutation dar. Damit zeigen die Analysen, dass für die CDV-A75/17red-Infektion von H358-Zellen keine funktionellen Mutationen im F- und H-Protein nötig sind (Tab. 11). Des Weiteren wurde auch im N-Gen und im M-Gen des CDV-H358 keine Änderung der Nukleotid- und Aminosäuresequenz in dessen kodierenden Bereich detektiert. Das parentale Virus weist im M-Protein, im Vergleich zur Datenbanksequenz, zwei exprimierte Mutationen, Y26H und V32A, und zusätzlich die stille Mutation, 3515 nt T zu C, auf (Tab. 11). Zusätzlich wurden im P-Protein und im L-Protein Mutationen detektiert, welche nicht im parentalen Virus zu erkennen sind. Diese sind nur zu einem gewissen Anteil vorhanden, so dass im Elektropherogramm auf Nukleotidebene an bestimmten Positionen verschiedene Nukleotide gleich stark vertreten sind (Abb. 17).

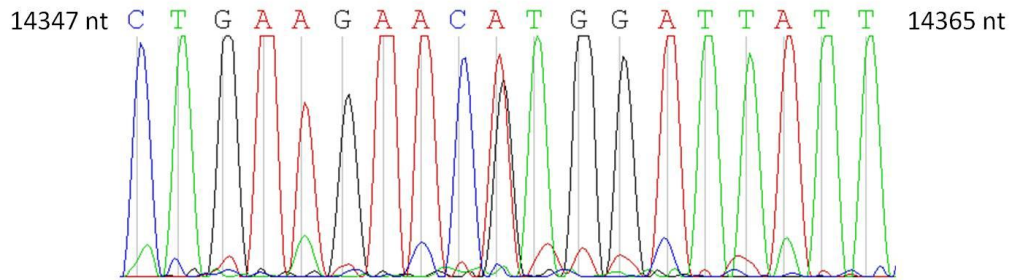


Abbildung 17: Elektropherogramm der CDV-H358-Sequenz

Der Sequenzausschnitt des L-Gens von CDV-H358 zeigt, dass an Position 14356 sowohl ein A als auch ein G vorhanden ist (blau Cytosin C, grün Thymin T, schwarz Guanin G, rot Adenin A).

So kann es auf Proteinebene zu den Mutationen A45V und Q102L im P-Protein kommen. Im L-Gen sind die Mutationen N1775S und T1778A möglich. Die Mutation bei Nukleotid 13772, A zu G, im L-Gen ist eine stille Mutation und wurde auch im parentalen Virus nachgewiesen. Weitere Mutationen waren auch in den intergenischen Regionen im Vergleich zu der Datenbanksequenz (AF 164.967.1) vorhanden. Bei diesen Mutationen handelt es sich um eingefügte Schnittstellen, welche für die Herstellung des rekombinanten tdTomato-exprimierenden Virus nötig waren (Plattet et al. 2004). So befindet sich in der intergenischen Region von N zu P eine *NotI*-Schnittstelle (1689 – 1696 nt), zwischen dem P- und M-Gen eine *PmeI*-Schnittstelle (3348 – 3355 nt), eine *BstEII*-Schnittstelle zwischen dem M und dem tdTomato-Gen, in der intergenischen Region von F zu H eine *MluI*-Schnittstelle (7016 – 7021 nt) und eine *BssHII*-Schnittstelle im L-Gen (9024 – 9029 nt).

Tabelle 11: Übersicht über die Mutationen im CDV-H358

Die Tabelle zeigt die Mutationen auf Nukleotid- und Aminosäureebene des CDV-H358 (4. Passage) und des parentalen CDV-A75/17red im Vergleich zur Datenbanksequenz CDV-A75/17red AF 164.967.1).

Gen	Position (nt)	CDV-H358 Mutation in der Nukleotidsequenz *	CDV-H358 Mutation in der Aminosäuresequenz *	Mutation im parentalen CDV-75/17red *
Nukleokapsid (Gen 56-1738 nt; CDS 108-1679 nt)		Keine Mutation	keine Mutation	keine Mutation
Phosphoprotein (Gen 1742-3396 nt; CDS 1801-3324 nt)	1689	A zu G	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	1691	CAGT zu GGCC	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	1696	T zu C	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	1934	T und C gleicher stark (Datenbank Nukleotid: C)	A45 V Mutation möglich	Nicht vorhanden
	2105	A und T gleich stark (Datenbank Nukleotid: A)	Q102L Mutation möglich	Nicht vorhanden
	2211	T zu C gleich stark (Datenbank Nukleotid: T)	stille Mutation	Nicht vorhanden
	2252	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	G zu A, S151N
	2368	T zu C	Stille Mutation	Stille Mutation
	3348-3355	AACAGGCA zu GTTTAAAC	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	3362	T zu G	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
Matrix (Gen 3400-4846 nt; CDS 34323-4439 nt)	3507	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	T zu C, Y26H
	3515	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	T zu C, stille Mutation
	3526	Nicht vorhanden	Nicht vorhanden	T zu C, V32A
Fusion (Gen 4850-7055 nt; CDS 4935-6923 nt)	5366	T zu C	Stille Mutation	Stille Mutation
	7014	A zu C	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	7017-7019	GTG zu CGC	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	7021	A zu T	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	7276	A zu G	stille Mutation	stille Mutation
Hämagglutinin (Gen 7059-9004 nt; CDS 7079-8902 nt)				
	9024-9028	TTAGT zu GCGCG	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	10824	G und A gleich stark vorhanden (Datenbank Nukleotid G)	D599N Mutation möglich	Nicht vorhanden
	13772	A zu G	Stille Mutation	Stille Mutation
	14356	G und A gleich stark in einer von 3 Sequenzen (Datenbank Nukleotid A)	N1775S Mutation möglich	Nicht vorhanden
	14364	G und A gleich stark in einer von 3 Sequenzen (Datenbank Nukleotid A)	T1778A Mutation möglich	Nicht vorhanden
14687	T zu C	Stille Mutation	Stille Mutation	

* Nummerierung und Auswertung nach CDV A75/17 Genbank AF164967.1

4.1.4. Herstellung von Nectin4-exprimierenden Vero-Zelllinien

Die Herstellung von humanen und caninen Nectin4-exprimierenden Vero-Zelllinien (hN4, cN4) erfolgte mit einem 3-Komponenten-lentiviralen-Vektorsystem. Hierfür wurden zuerst lentivirale Partikel generiert, welche das Nectin4-exprimierende Plasmid enthalten.

Für die Herstellung von lentiviralen Partikeln, die das humane Nectin4 enthalten, musste zuerst das Gen in ein lentivirales Plasmid kloniert werden. Das, für das hN4-kodierende cDNA-Fragment wurde dafür aus dem pCMV6-hN4-Plasmid mit den Restriktionsenzymen *SmaI* und *BamHI* und dem 10 x Multicore-Puffer (Promega) enzymatisch herausgeschnitten (siehe 3.3.6., Abb. 18). Anschließend wurde der Restriktionsverdau auf einem 1%igem Agarosegel aufgetrennt und das Gelstück mit dem 1702 bp langen Fragment ausgeschnitten (3.3.1.). Die Bande bei 4707 bp ist das verbleibende Plasmid. Es folgte eine Gelextraktion des Fragments mit dem „QIA quick® Gelextraktion Kit“ (siehe 3.3.12.). Das aufgereinigte hN4-Fragment kann im Anschluss in das lentivirale Plasmid pF6gWdsRed ligiert werden (Abb. 18). Hierzu wurde das Rot-fluoreszierende dsRed-Gen aus dem Plasmid mittels enzymatischen Restriktionsverdau entfernt (siehe 3.3.6.). Hierfür kann dann das hN4-Fragment eingebaut werden. Die Entfernung des Fluoreszenzgens war nötig, um eine nichtfluoreszierende Zelllinie zu generieren. Das lentivirale pF6gWdsRed-Plasmid wurde zuerst mit dem Restriktionsenzym *EcoRI* (Promega) linearisiert und anschließend mit dem *Klenow-Fragment* (Fermentas) behandelt (siehe 3.3.6., 3.3.7.). Dieses Enzym besitzt eine 5'→3'-Polymerase-Aktivität und die 3'→5'-Exonuklease-Aktivität (*proof reading*) und ermöglicht dadurch die Herstellung von glatten Fragmentenden. Ein weiterer Verdau des linearisierten pF6gWdsRed-Plasmids wurde mit dem Restriktionsenzym *BamHI* durchgeführt. Der Plasmidverdau wurde mit einer 1%igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und das benötigte Vektorfragment einer Länge von 9527 bp mit dem „QIA quick® Gelextraktion Kit“ aufgereinigt (siehe 3.3.1. und 3.3.12.). Daraufhin erfolgte eine Dephosphorylierung des Konstruktes mit der *Calf-intestine-Phosphatase* (CIAP, Fermentas), um Religationen des Vektors zu vermeiden (siehe 3.3.8.). Anschließend wurde die Ligation des lentiviralen pF6gW-Fragmentes mit dem hN4-Fragment durchgeführt (siehe 3.3.9.). Hierfür wurden die molaren Verhältnisse von 1:3 und 1:5 von Vektor zu einzufügendem Konstrukt mit jeweils 50 ng und 100 ng an Vektormaterial für die Ligation verwendet. Das pF6gW-human-Nectin4-Plasmid (pF6gW-hN4) konnte mittels Hitzeschock in *E. coli XL10-Gold*-Bakterien transformiert werden (siehe 3.4.2.). Die gewachsenen Bakterienklone wurde in 20 µl H₂O resuspendiert und mit zwei unterschiedlichen PCRs überprüft (siehe 3.3.5.2 und 6.2.). Die verwendeten Primer waren zunächst F6gWfw1MB und F6gWrev1MB, welche beide im Vektor des lentiviralen Plasmids F6gW binden. Für die zweite PCR wurden dann die Primer F6GWfw1MB und hNectin4revMB verwendet, wobei der Rückwärtsprimer im hN4-Fragment bindet. Von 20 überprüften Klonen waren 12 positiv für das eingefügte Konstrukt. Von diesen wurden vier positive Klone im großen Maßstab gezüchtet und mittels Plasmid-Maxipräparation die Plasmidkonstrukte isoliert (siehe 3.4.4.2.).

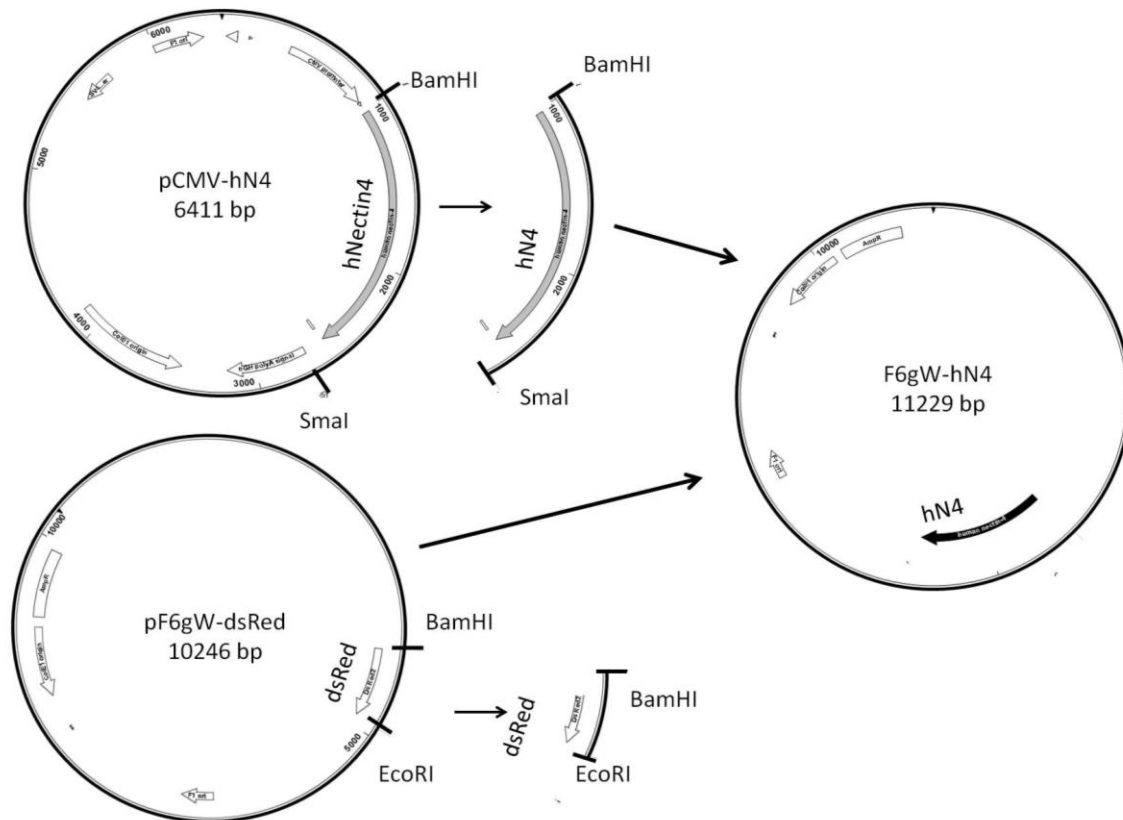


Abbildung 18: Klonierungsmodell des pF6gW-humanen-Nectin4-Plasmids

Das humane Nectin4-Gen wurde aus dem pCMV-hN4-Plasmid mittels der Restriktionsenzyme *SmaI* und *BamHI* ausgeschnitten. Aus dem pF6gW-dsRed-Vektor wurde das Rot-fluoreszierende dsRed-Gen mittels der Schnittstelle *BamHI* und *EcoRI* ausgeschnitten. Das hN4-Fragment wurde dann in das Vektorkonstrukt ligiert. Das entstandene Plasmid pF6gW-hN4 hat eine Länge von 11229 bp und exprimiert das humane Nectin4.

Dieses F6gW-hN4-Plasmid konnte dann mit weiteren wichtigen Plasmiden, pMDLg/pRRE und pVSV-G und pRSVrev, in die Zelllinie 293T mittels PEI transfiziert werden (siehe 3.2.7.). Durch die PEI-Transfektion der Plasmide in diese Zelllinie werden lentivirale Partikel generiert und in den Überstand der Zellen sezerniert. Diese lentiviralen F6gW-hN4-Partikel konnten zwei bis drei Tagen nach Transfektion aus dem Mediumüberstand durch Filtration isoliert werden. Hierzu wurden Millipore Filter mit 100'000 MWCO (Amplicon) verwendet (siehe 3.2.8). Der virale Titer konnte mittels der Endpunkttitration auf Vero-Zellen bestimmt werden (siehe 3.2.6.2.).

Für die Herstellung einer stabilen Zelllinie wurden Vero-Zellen mit den lentiviralen Partikeln F6gW-hN4, kodierend für den humanen Nectin4 Rezeptor, transduziert (Vero-hN4-Zelllinie). Es wurde mit einer MOI von 2 transduziert und die Zellen bis zu sieben Tage inkubiert. Die Transduktionseffizienz wurde sowohl mit einer Immunfluoreszenzfärbung als auch mit einer Durchflusszytometrie mit hN4-Antikörper analysiert und quantifiziert (MAB2658, siehe 3.5.1.1. und 3.5.2.). Um eine unspezifische Färbung der Zellen auszuschließen, wurden Vero-Zellen mit denselben Antikörpern markiert und als Negativkontrolle verwendet (Abb. 19). Die Auswertung der Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie für die Vero-hN4-Zellen ergab eine mittlere Fluoreszenzintensität von 547,46 (Median 324,88)

über die Gesamtzellzahl. Die Negativkontrolle zeigte eine durchschnittliche Fluoreszenzintensität von 5,01 (Median 2,75) über die Gesamtzellzahl auf. Eine Kultivierung dieser Vero-hN4-Zellen über zehn Passagen zeigte eine stabile Oberflächenexpression des Rezeptors ohne Veränderung in der Expressionseffizienz. Des Weiteren zeigte die Immunfluoreszenzfärbung der Zellen eine deutliche Grünfluoreszenz und damit ein starkes Signal für das hN4 auf den Zellen, welches über zehn Passagen unverändert blieb (Abb. 19 B).

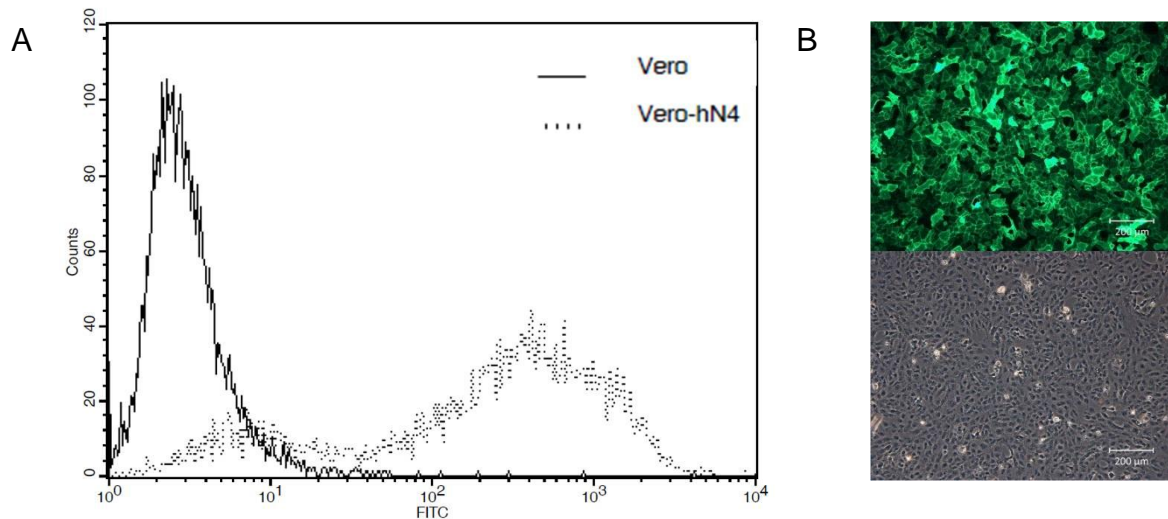


Abbildung 19: Expression von humanem Nectin4 auf Vero-hN4-Zellen

Für die Durchflusszytometrie wurden Vero-Zellen (durchgezogene Linie) und Vero-hN4-Zellen (gepunktete Linie) mit einem murinen, monoklonalem humanem Nectin4 Antikörper (MAB2658, R&D Systems) und dem sekundären Antikörper FITC-konjugierten Immunglobulin Maus Antikörper (Dako A/S) markiert (A). Für die Mikroskopie wurden Vero-hN4-Zellen fünf Tage nach Transduktion mit MAB2658-Antikörper und sekundären Alexa-Fluor-488 anti-Mause IgG (Invitrogen) gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop fotografiert (B, Balken = 200 µm).

Für die Herstellung einer Vero-Zelllinie, welche das canine Nectin4 (cN4) exprimiert, wurde das lentivirale Vektorkonstrukt pRRL-cN4 verwendet (freundliche Gabe von Philippe Plattet). Dieses Konstrukt konnte in Vero-Zellen transduziert und die Transduktionseffizienz mittels Durchflusszytometrie bestimmt werden. Die Transduktion erfolgte mit 1 ml pRRL-cN4 lentiviralen Partikeln in $1,5 \times 10^5$ Vero-Zellen in einer 6-Napfplatte. Zwei Tage nach Transduktion konnte eine erneute Transduktion mit gleicher Zellzahl durchgeführt werden (2. Transduktion). Die Transduktion wurde insgesamt viermal wiederholt, um die Anzahl an cN4-positiven Zellen zu erhöhen. Die Vero-cN4-Zellen der ersten bis vierten Transduktion wurden mit primären MAB2658-Antikörper und sekundärem FITC-konjugierten anti-Maus Antikörper (Dako A/S, 27 ng/µl) gefärbt und die Oberflächenexpression in der Durchflusszytometrie analysiert (siehe 3.5.1.1.). Die Tabelle 12 stellt den Mittelwert und den Median der Fluoreszenzintensitäten der jeweiligen Transfektionsstufen dar. Es zeigt sich mit zunehmender Transfektionsrate eine Zunahme der Fluoreszenzintensität und eine Steigerung des Medianwertes.

Tabelle 12: Analyse der Transduktionseffizienz von Vero-cN4-Zellen mittels Durchflusszytometrie

Vero-Zellen wurden mit den lentiviralen pRRL-cN4-Partikeln transduziert und die Expressionsrate mittels Durchflusszytometrie ermittelt. Die Zellen wurden mit dem monoklonalen anti-humanen Nectin4 Antikörper (MAB2658, R&D Systems) und dem sekundären FITC-konjugierten Maus-Antikörper gefärbt (Dako A/S). Die Oberflächenexpression des Nectin4 wurde nach jeder Transduktion unter gleichen Bedingungen ermittelt. Die Werte beziehen sich auf die Gesamtzellzahl.

	Mittelwert der Fluoreszenzintensität	Median der Fluoreszenzintensität	Tag der Analyse nach Transfektion
1. Transduktion	8,20	4,18	17
2. Transduktion	11,77	5,88	14
3. Transduktion	19,04	11,55	11
4. Transduktion	18,82	11,97	3
Vero-Zellen	4,27	2,89	

Die Vero-cN4-Zellen der vierten Transfektion (Vero-cN4-4T) zeigen drei Tage nach Transfektion, im Vergleich zu der dritten Transfektion, nur eine geringe Zunahme der Fluoreszenzintensität. Um die Fluoreszenzintensität und damit die Rezeptorexpression auf den Vero-cN4-4T-Zellen zu erhöhen wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie sortiert. Die Sortierung auf N4-Oberflächenexpression erfolgte mit 1×10^6 Vero-cN4-4T-Zellen in der vierten Passage. Dabei wurden die gleichen Antikörper wie für die Durchflusszytometrie verwendet (siehe 3.5.1.2.). Die Vero-cN4-4T-Zellen des oberen Quartils des FITC-Kanals wurden hierfür ausgewählt und in ein neues Röhrchen sortiert. Eine Kontrollanalyse, sofort nach der Sortierung, ergab 94,6% N4-exprimierende-Zellen (Vero-cN4-4TS). Nur diese sortierten Vero-cN4-4TS-Zellen wurden in Medium mit 2-facher Antibiotikakonzentration für zwei Wochen kultiviert, um Kontaminationen zu vermeiden. Um die Effizienz der Zellsortierung zu überprüfen, wurden eine Durchflusszytometrie für die N4-Oberflächenexpression von Vero-cN4-4T- und Vero-cN4-4TS-Zellen, sechs Tagen nach der Sortierung, durchgeführt. Die Abbildung 20 zeigt die Verstärkung der Fluoreszenzintensität der Vero-cN4-4TS-Zellen im Vergleich zu den Vero-cN4-4T-Zellen (Abb. 20 A). Als Negativkontrolle und Referenzwert wurden parentale Vero-Zellen mit beiden Antikörpern behandelt. Für die Vero-cN4-4TS-Zellen wurde ein Mittelwert von 343,67 und ein Median von 271,39 ermittelt. Die Vero-cN4-4T-Zellen (6. Passage) lieferten einen Mittelwert von 224,08 und einen Median von 139,49 nach 15 Tage nach Transduktion. Damit ist eine Verbesserung der Fluoreszenzintensität aufgrund der Sortierung vorhanden. Für die folgenden Versuche wurden die Vero-cN4-4TS-Zellen verwendet. Eine Immunfluoreszenzfärbung der Vero-cN4-4TS-Zellen mit dem MAB2658-Antikörper und sekundären Alexa-Fluor-488 Maus IgG zeigte eine deutliche Grünfluoreszenz im Fluoreszenzmikroskop (siehe 3.5.2.). Des Weiteren war keine Änderung in der Zellmorphologie und der Replikationsrate der Zellen aufgrund des transduzierten Rezeptors erkennbar (Abb. 20 und 21).

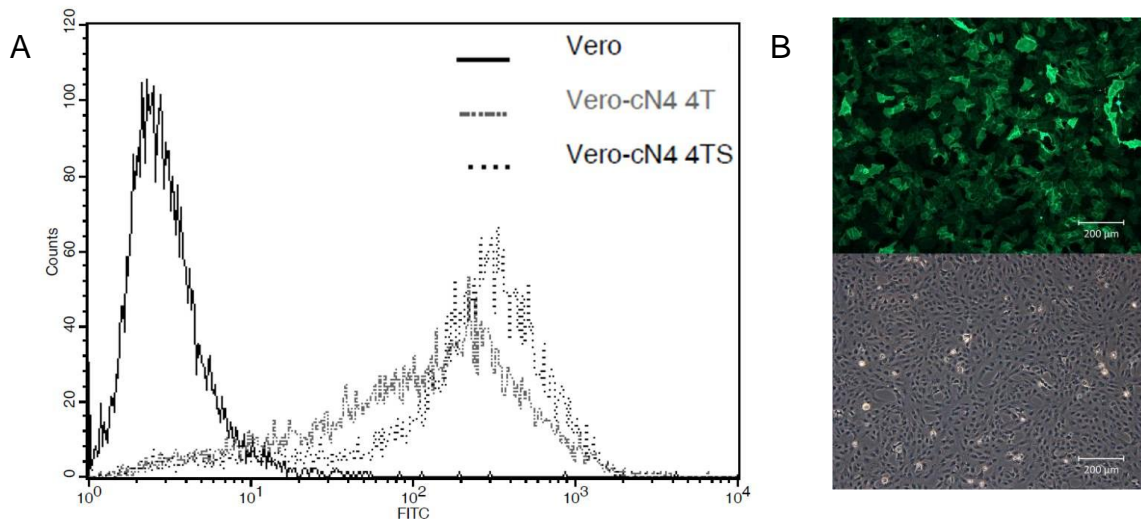


Abbildung 20: Expression von caninem Nectin4 auf Vero-cN4-4T und Vero-cN4-4TS Zellen

Für die Durchflusszytometrie wurden Vero-Zellen (Linie), Vero-cN4-4T-Zellen (grau, gestrichelte Linie) und Vero-cN4-4TS-Zellen (grau, gepunktete Linie) mit einem monoklonalen Maus anti-human Nectin4 Antikörper (MAB2658, R&D Systems) und dem 2. Antikörper FITC Immunglobulin Kanninchen anti-Maus Antikörper (Dako A/S) markiert. Eine Immunfluoreszenzfärbung von Vero-cN4-4TS-Zellen mit MAB2658-Antikörper und sekundären Alexa-Fluor-488 anti-Mause IgG (Invitrogen) ist in B zu sehen (B, Balken = 200 µm).

Die Proliferationsrate der N4-exprimierenden Vero-Zellen, im Vergleich zu parentalen Vero-Zellen, wurde anhand einer CFSE-Färbung und einer anschließenden durchflusszytometrischen Analyse bestimmt (siehe 3.5.1.1.). Die Abbildung 21 zeigt die Messung der Grünfluoreszenz nach vier Tagen nach CFSE-Behandlung der jeweiligen Zellen. Als Referenz wurden zum einen parentale Vero-Zellen und zum anderen eine CFSE-markierte und zusätzlich fixierte Probe der jeweiligen Zelllinie verwendet. Die Auswertung der CFSE-Fluoreszenz mittels Durchflusszytometrie zeigt keinen Unterschied in der Grünfluoreszenz von Vero-, Vero-cN4-4TS- und Vero-hN4-Zellen nach vier Tagen nach CFSE-Färbung.

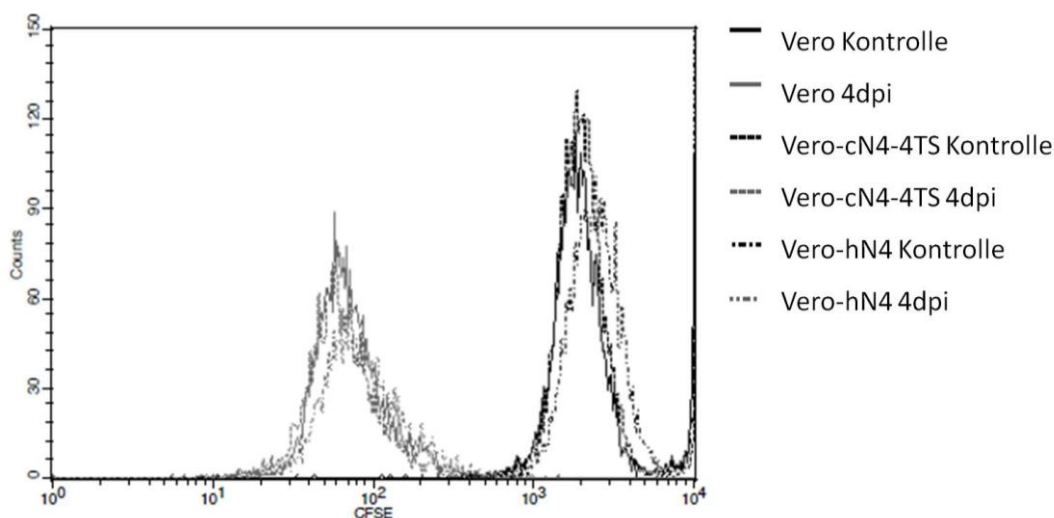


Abbildung 21: Vergleich der Zellteilungsrate von Vero-, Vero-cN4-4TS- und Vero-hN4-Zellen

Vero- (Linie), Vero-cN4-4TS- (gepunktete Linie) und Vero-hN4-Zellen (gestrichelte Linie) wurden mit CFSE-Farbstoff markiert und vier Tage nach Färbung analysiert. Als Kontrolle wurde ein Teil dieser CFSE-markierten Zelllinien mit 4%iger PFA-Lösung fixiert (schwarze Linien). Der in den Zellen entstehende grünfluoreszierende Farbstoff wurde anhand der Durchflusszytometrie analysiert.

4.1.5. Virusvermehrung von CDV-A75/17red und MV-IC323eGFP auf cN4- und hN4-exprimierenden Vero-Zelllinien

Die Wachstumskinetik von rekombinatem, wildtypischem CDV-A75/17red auf unterschiedlichen N4-exprimierenden Zellen wurde über einen Zeitraum von fünf Tagen analysiert. Hierfür wurden 4×10^5 Vero-, Vero-cN4-4TS- und Vero-hN4-Zellen in einer 25 cm² Flasche mit einer MOI von 0,01 mit CDV-A75/17red für 3 h unter FCS-freien Bedingungen infiziert (siehe 3.2.2.1.). Über einen Zeitraum von fünf Tagen wurden die infizierten Zellen in 1% FCS-haltigen MEM im 33°C Brutschrank kultiviert. Die fluoreszenzmikroskopischen Bilder zeigen sowohl in den Vero-cN4-4TS-Zellen, als auch in den Vero-hN4-Zellen eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz im Laufe des Versuches (Abb. 22 A und B). Als Kontrolle dienten Vero-Zellen, die kein N4 an ihrer Oberfläche exprimieren (Abb. 20). Diese Zellen lassen sich kaum mit CDV-A75/17red infizieren (Abb. 22 C).

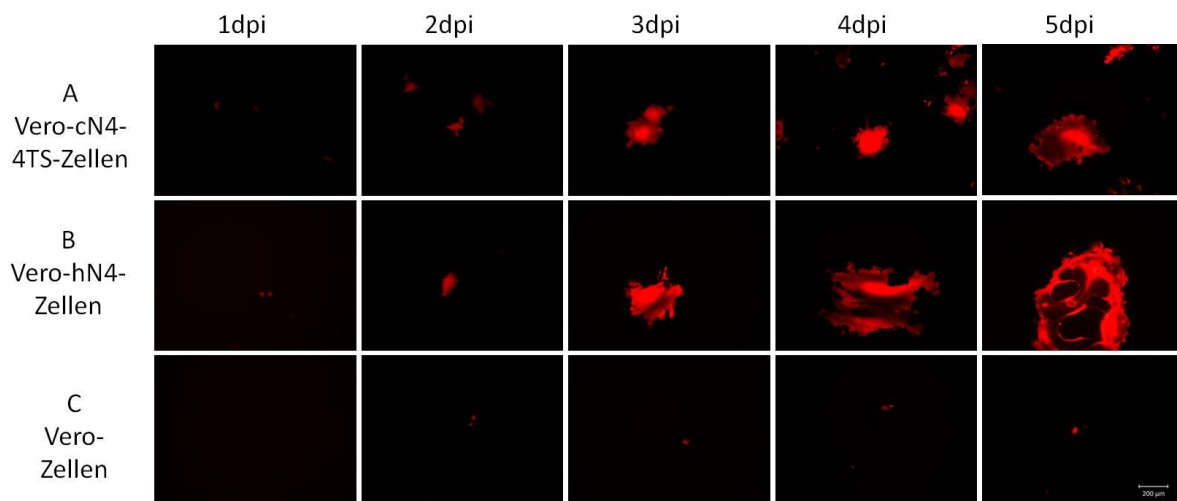


Abbildung 22: Immunfluoreszenzen von rekombinatem CDV-A75/17red infizierten Vero-cN4-4TS, Vero-hN4 und Vero-Zellen

Vero-cN4-4TS- (A), Vero-hN4- (B) und Vero-Zellen (C) wurden mit CDV-A75/17red mit einer MOI von 0,01 infiziert. Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen wurden im 24 h Turnus gemacht, um die Fluoreszenz des tdTomato-Rot exprimierenden Virus zu dokumentieren (Balken = 200µm).

Um die Replikationskinetik des rekombinanten CDV-A75/17red auf den speziesspezifischen Nectin4-Rezeptoren genauer zu analysieren, wurde zudem der virale Titer bestimmt. Dafür wurde täglich eine Zellkulturflasche mit infizierten Zellen mit 1 ml Mediumüberstand geerntet, das Virus aus den Zellen isoliert und anschließend der Titer der Viruspräparation auf Vero-cSLAM-Zellen mittels Plaquetest bestimmt (siehe 3.2.4. und 3.2.6.1.). In Abbildung 23 sind die Titeranalysen graphisch dargestellt. Einen Tag nach Infektion ist ein Unterschied zwischen der Infektion von Vero-cN4-4TS- (4×10^1 pfu/ml) und Vero-hN4-Zellen ($> 10^1$ pfu/ml) mit CDV-A75/17red vorhanden. An Tag zwei und drei ist eine deutliche Zunahme des viralen Titers messbar. Der maximale Virustiter für Vero-cN4-4TS-Zellen (4×10^2 pfu/ml) und Vero-hN4-Zellen ($1,5 \times 10^2$ pfu/ml) ist drei Tage nach Infektion erreicht. An Tag vier und fünf der Wachstumskinetik stagniert der Virustiter bzw. nimmt etwas ab. Die Versuche wurden in unabhängigen Triplikaten

durchgeführt. Es zeigte sich, dass kein signifikanter Unterschied im resultierenden Titer zwischen Vero-hN4- und Vero-cN4-4TS-Zellen vorhanden ist (Abb. 23). Als Kontrolle wurden Vero-Zellen infiziert, die kein Nectin4 an der Oberfläche exprimieren.

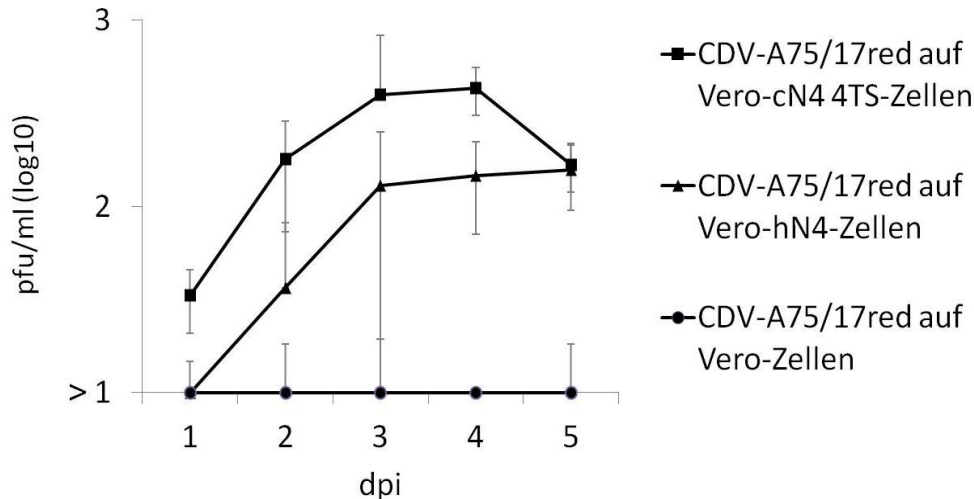


Abbildung 23: Wachstumskurve von CDV-A75/17red auf Nectin4-exprimierenden und parental Vero-Zellen

Die Infektion von Vero-cN4-4TS- (Quadrat), Vero-hN4- (Dreieck) und Vero-Zellen (Kreis) erfolgte mit CDV-A75/17red mit einer MOI von 0,01. Nach ein bis fünf Tagen wurde das Virus geerntet, präpariert und der Titer auf Vero-cSLAM Zellen mittels Plaquetest bestimmt (n=3).

Eine weitere Kinetikanalyse wurde mit dem MV-IC323eGFP in Triplikaten durchgeführt. Hierfür wurden die gleichen Bedingungen wie für die Wachstumskurve von CDV-A75/17red auf den N4-exprimierenden-Zellen verwendet (MOI 0,01; 5 Tage). Die Virustiterbestimmungen wurden auf Vero-hSLAM-Zellen mit der Plaquetest-Methode durchgeführt (siehe 3.2.6.1.). Die Abbildung 24 zeigt einen fast identischen Kurvenverlauf von MV-IC323eGFP auf Vero-hN4- und Vero-cN4-4TS-Zellen. Als Referenz wurden auch Vero-Zellen, die nicht das N4 exprimieren, infiziert. An Tag eins und zwei ist keine Unterschied des viralen Titers von parental Vero-Zellen und N4-exprimierenden-Vero-Zellen zu sehen (Abb. 23). Ab Tag drei bleibt der virale Titer von MV-IC323eGFP-infizierten Vero-Zellen konstant bei etwa 10^3 pfu/ml. Der virale Titer von infizierten N4-exprimierenden-Vero-Zellen nimmt jedoch bis Tag fünf weiter zu (Abb. 24).

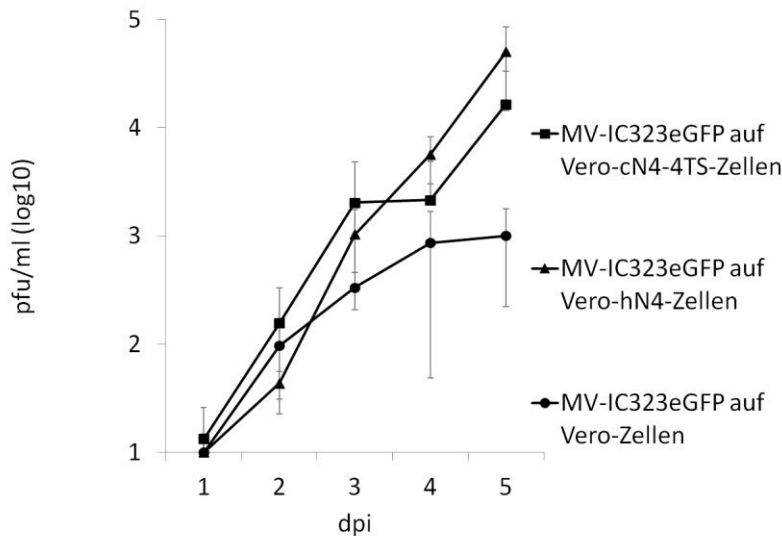


Abbildung 24: Wachstumskurve von MV-IC323eGFP auf Nectin4 exprimierenden und parental Vero-Zellen

Die Infektion von Vero-cN4-4TS-Zellen (Quadrat), Vero-hN4- (Dreieck) und Vero-Zellen (Kreis) erfolgte mit MV-IC323eGFP mit einer MOI von 0,01. Nach eins bis fünf Tagen wurde das Virus geerntet, präpariert und der Titer auf Vero-hSLAM Zellen mittels Plaquetest bestimmt (n=3).

4.2. Adaptierung von rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red an humanes SLAM (CD150)

Die Infektion von Lymphozyten, Makrophagen und Dendritischen Zellen mit einem Morbillivirus erfolgt mittels des speziesspezifischen SLAM (siehe 1.4.1.). Entsprechend benutzt CDV hierfür das canine SLAM (cSLAM) und das MV gelangt über das humane SLAM (hSLAM) in seine natürlichen Zielzellen. Um eine CDV-Infektion von humanen Zielzellen zu ermöglichen, muss sich das CDV an das humane Wirtssystem anpassen. Für die Aufnahme des CDV in die humanen Zielzellen, muss zuerst eine Anpassung an das hSLAM stattfinden. In den folgenden Versuchen wurde die Adaptierung von CDV-A75/17red an das hSLAM, anhand von hSLAM-exprimierenden Vero-Zellen, untersucht und die dafür nötigen Mutationen des CDV ermittelt.

4.2.1. Adaptierung von CDV-A75/17red an Vero-hSLAM Zellen

Für die Adaptierung bzw. Selektion von rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red wurde eine hSLAM-exprimierende Vero-Zelllinie verwendet (Abb. 25 und 26). Für die Durchflusszytometrie wurden Vero-hSLAM- und Vero-cSLAM-Zellen mit zwei verschiedenen Maus hSLAM-Antikörpern (A12 BD Pharmingen 10 ng/µl, 5C6 Exbio 17 ng/ µl) behandelt und anschließend jeweils mit dem sekundären FITC-konjugierten anti-Maus Antikörper (Dako A/S, 27ng/µl) inkubiert. Die Verwendung von zwei unterschiedlichen hSLAM-Antikörpern für die Detektion der Oberflächenexpression soll zeigen, dass man mit hSLAM-Antikörpern nur das hSLAM und nicht das cSLAM detektieren kann und damit eine Speziesbarriere zwischen Mensch und Hund vorhanden ist. Die Auswertung der Vero-hSLAM Zellen

ergab sowohl für die Färbung mit dem primären Antikörper A12 als auch für die Färbung mit dem primären Antikörper 5C6 eine Zunahme der Grünfluoreszenz (Abb. 25). Als Negativkontrolle wurden parentale Vero-Zellen verwendet. Die Vero-cSLAM-Zellen zeigen kein Grün-fluoreszierendes Signal in der Durchflusszytometrie (Abb. 25 und 26). Die beiden monoklonalen Antikörper sind also spezifisch für das humane SLAM (CD150) und erkennen das c-SLAM nicht.

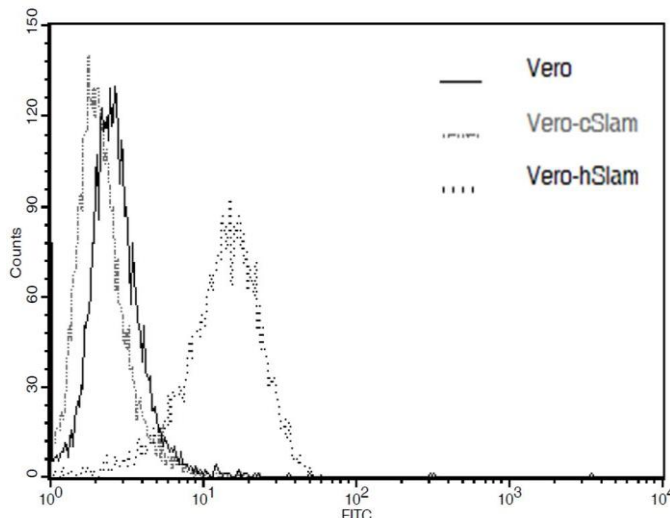


Abbildung 25: Oberflächenexpression von SLAM-exprimierenden Vero-Zelllinien mit dem monoklonalen hSLAM-Antikörper A12

Für die Durchflusszytometrie wurden Vero- (Linie), Vero-cSLAM- (grau, gestrichelte Linie) und Vero-hSLAM-Zellen (grau, gepunktete Linie) mit dem den primären murinen hSLAM-Antikörper (A12, BD Pharmingen) behandelt und anschließend mit dem sekundären FITC-konjugierten Maus-Antikörper (Dako A/S) inkubiert.

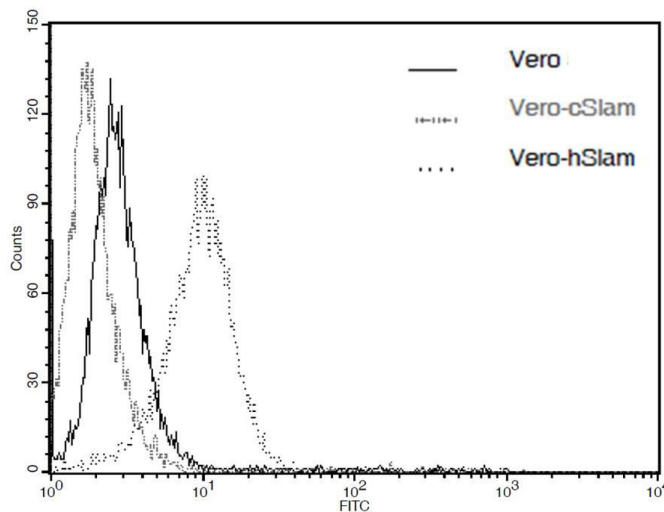


Abbildung 26: Oberflächenexpression von SLAM exprimierenden Vero-Zelllinien mit dem monoklonalen hSLAM-Antikörper 5C6

Für die Durchflusszytometrie wurden Vero- (Linie), Vero-cSLAM- (grau, gestrichelte Linie) und Vero-hSLAM-Zellen (grau, gepunktete Linie) mit dem den primären murinen hSLAM-Antikörper (5C6, Exbio) behandelt und anschließend mit dem sekundären FITC-konjugierte Maus-Antikörper (Dako A/S) inkubiert.

Die cSLAM-Oberflächenexpression von Vero-cSLAM-Zellen wurde von Seki et al. 2003 gezeigt. In Abbildung 27 ist die MV-IC323eGFP Infektion von Vero-hSLAM-Zellen (A) und die CDV-A75/17red Infektion von Vero-cSLAM-Zellen (B) mit einer MOI von 0,01 nach zwei Tagen zu sehen (Abb. 27). Die Synzytienbildung und die Expression der viruspezifischen Fluoreszenzgene belegt die speziesspezifische Infektion der cSLAM- und hSLAM-exprimierenden Vero-Zellen.

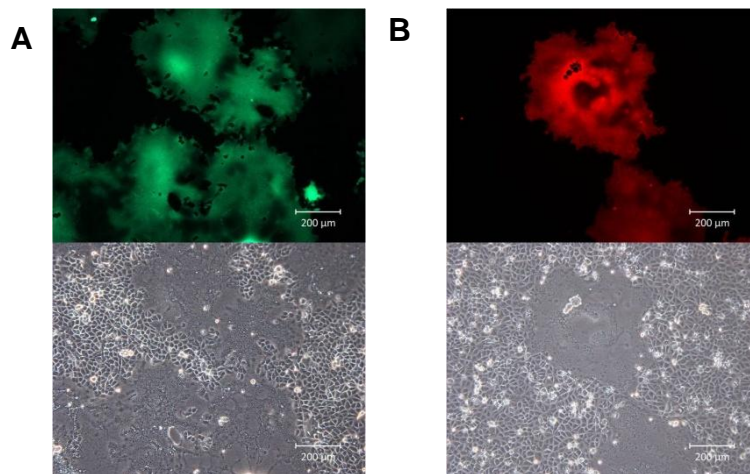


Abbildung 27: Infektion der Vero-hSLAM Zellen mit MV-IC323eGFP und Vero-cSLAM Zellen mit CDV-A75/17red

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit dem MV-IC323eGFP (A) und Vero-cSLAM Zellen mit dem CDV-A75/17red (B) mit einer MOI von 0,01 infiziert. Die Aufnahmen der Fluoreszenz des eGFP-exprimierenden MV-IC323eGFP (A) und des tDTomato-Rot exprimierenden CDV-A75/17red (B) wurden nach zwei Tagen mit dem Fluoreszenzmikroskop fotografiert (B, oben UV-Lichtaufnahme; unten Hellfeldaufnahme, Balken = 200 µm).

Die Adaptierung von CDV-A75/17red an Vero-hSLAM Zellen konnte in einem ersten Versuch in der Diplomarbeit von Jung Woo Han, gezeigt werden (Han J. W. 2010). In dieser Doktorarbeit konnten die Ergebnisse der CDV-A75/17red Adaptierung an Vero-hSLAM-Zellen (CDV-hSLAM) in unabhängigen Triplikaten, wiederholt, über längeren Zeitraum passagiert und damit die Adaptierung bestätigt werden. In der ersten Passage wurden Vero-hSLAM Zellen mit einer MOI von 1 infiziert und für vier Tage inkubiert. Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen zeigen eine deutliche Ausbreitung der Rotfluoreszenz über diesen Zeitraum (Abb. 28). Das Virus wurde nach vier Tagen geerntet, präpariert und anschließend wurde, mit einer MOI von 0,01, neue Vero-hSLAM-Zellen infiziert (1. Passage des Virus). Die zweite Viruspassage wurde, im Gegensatz zu (Han J. W. 2010), erneut nach vier Tagen geerntet und präpariert. In der dritten Passage wurden Vero-hSLAM Zellen mit einer MOI von 0,01 für drei Tage inkubiert.

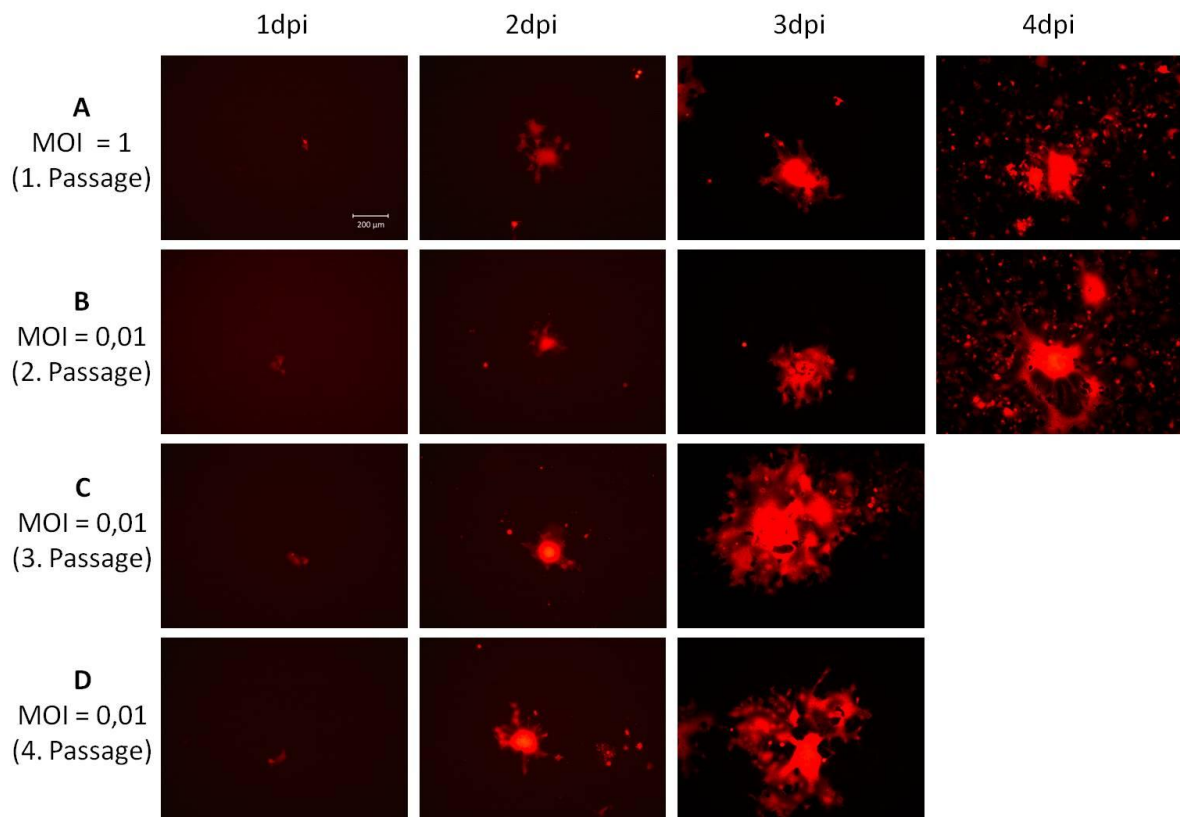


Abbildung 28: Infektion der Vero-hSLAM Zellen mit CDV A75/17red

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red mit einer MOI von 1 für die erste Passage infiziert (A). Die Fluoreszenzbilder zeigen jeweils die unterschiedlichen Zeitpunkte des Infektionsverlaufes. Nach vier Tagen wurde das Virus geerntet, auf Vero-cSLAM-Zellen titriert und anschließend auf Vero-hSLAM-Zellen für die zweite Passage mit einer MOI von 0,01 reinfiziert (B). Nach vier Tagen konnte das Virus wiederholt geerntet, titriert und auf Vero-hSLAM-Zellen für die dritte Passage mit einer MOI von 0,01 infiziert werden (C). In der vierten Passage konnte das Virus, wie in der dritten Passage, nach drei Tagen geerntet werden (D). Fotomikroskopische Aufnahmen der Fluoreszenz des tdTomato-Rot-exprimierenden Virus wurden unter UV-Licht gemacht (Balken = 200 µm).

Der Adaptierungsprozess von CDV-A75/17red auf Vero-hSLAM-Zellen und die Replikation von CDV-A75/17red in Vero-hSLAM-Zellen wurde mittels Plaquetest auf Vero-hSLAM-Zellen genauer analysiert. In Abbildung 29 ist eine Übersicht über die resultierenden Titerwerte der Adaptierung für die jeweilige Passage angegeben. Die Adaptierung des Virus wurde dafür in Triplikaten untersucht. Die erste Viruspassage auf Vero-hSLAM-Zellen hat einen Titer von 10^4 pfu/ml, die zweite Passage ergab einen Titer von 10^5 pfu/ml und in der dritten Passage war eine Zunahme des viralen Titers detektierbar (2×10^6 pfu/ml). In den folgenden Passagen verblieb der Titer konstant bei 10^6 pfu/ml. Des Weiteren wurde die Abhängigkeit von Titer und verwendeter Zelllinie getestet. Dazu wurden die jeweiligen Viruspassagen sowohl auf Vero-cSLAM-Zellen als auch auf Vero-hSLAM-Zellen titriert. Die Auswertung ergab für die erste Passage des CDV-hSLAM einen 10-fach höheren Titerwert bei einer Titration auf Vero-cSLAM-Zellen (10^4 pfu/ml) im Vergleich zu der Titration auf Vero-hSLAM-Zellen (10^3 pfu/ml). Ab der zweiten Passage des CDV-hSLAM ist kein Unterschied zwischen der Titration auf Vero-hSLAM-Zellen oder Vero-cSLAM-Zellen detektierbar. Die Plaquetests auf beiden Zelllinien liefern identische Titerwerte.

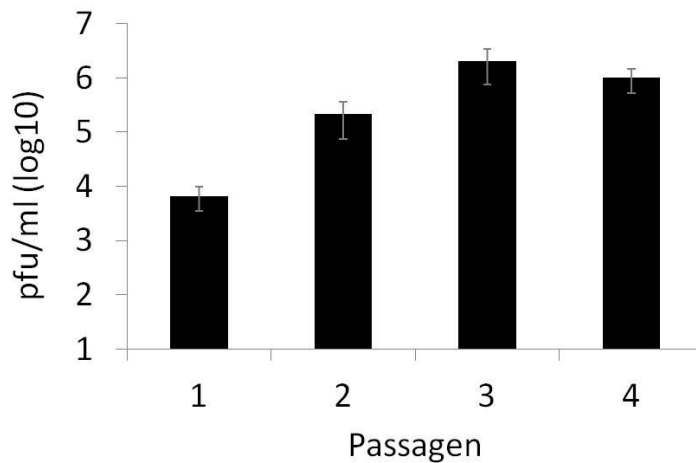


Abbildung 29: Virustiter des an humanes SLAM-adaptierten CDV-A75/17red (modifizierte Abbildung nach Bieringer et al. 2013)

CDV-A75/17red wurde auf Vero-hSLAM-Zellen passagiert und der Titer der jeweiligen Passage auf Vero-cSLAM-Zellen mittels Plaquetest bestimmt. Das an hSLAM-adaptierte CDV-A75/17red hat einen Titer von 10^4 pfu/ml für die erste Passage, für die zweite Passage einen Titer von 10^5 pfu/ml und für die dritte Passage einen Titer von 2×10^6 pfu/ml. (drei unabhängige Adaptierungen)

4.2.2. Virusvermehrung auf SLAM-exprimierenden Zellen

Der Infektionsverlauf eines Virus kann anhand von Immunfluoreszenzen und einer Wachstumskurve analysiert werden. Um die Infektionseffizienz des CDV-hSLAM, im Vergleich zum parentalen Virus, analysieren zu können, wurden Zellen mit einer MOI von 0,01 infiziert und für ein bis fünf Tage inkubiert. Die Infektion konnte mittels der Fluoreszenz des tdTomato-Rot-exprimierenden Virus unter UV-Licht fotografiert werden (siehe 3.2.2.1., Abb. 30). Die Fluoreszenzbilder von parentalem CDV-A75/17red auf Vero-cSLAM-Zellen und von CDV-hSLAM auf Vero-hSLAM-Zellen sind vergleichbar (Abb. 30). Von Tag eins bis Tag drei konnte eine deutliche Zunahme der Fluoreszenz detektiert werden. Des Weiteren ist ab Tag vier eine vollständige Infektion der Zellkultur zu erkennen, welche zu einem Ablösen der infizierten Zellen vom Flaschenboden führt. Die Vero-cSLAM-Zellen wurden auch mit dem CDV-hSLAM mit einer MOI von 0,01 infiziert. Auch in diesen Infektionsversuchen war eine deutliche Vermehrung der Fluoreszenz des tdTomato-Rot-exprimierenden Virus und eine zunehmende Synzytienbildung über fünf Tage im Fluoreszenzmikroskop zu sehen. Dieser Infektionsversuch zeigt, dass sich das CDV-hSLAM sowohl in den Vero-hSLAM-Zellen als auch in den parentalen Vero-cSLAM-Zellen vermehren kann (Abb. 30).

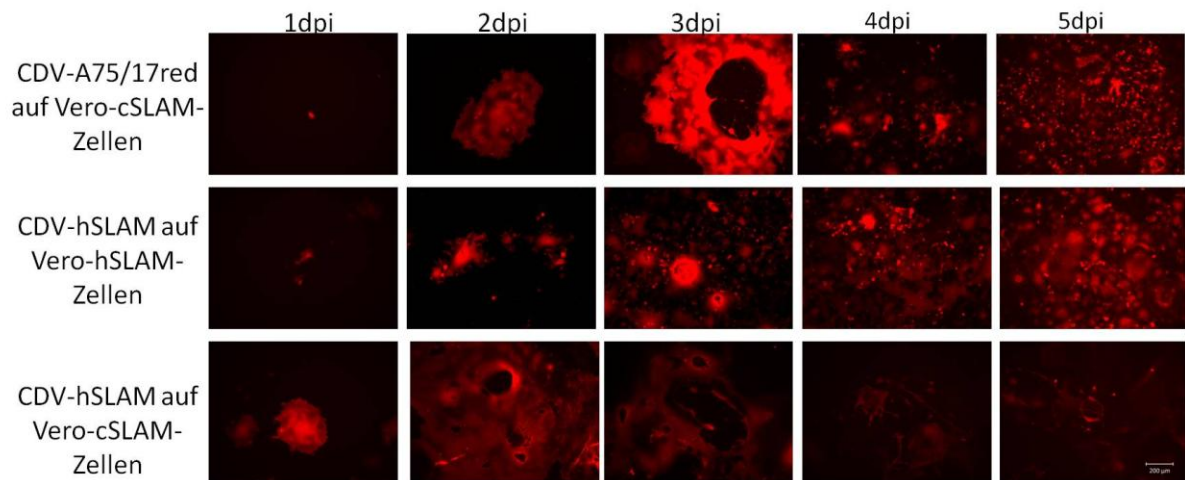


Abbildung 30: Immunfluoreszenzen von rekombinalem, wildtypischem CDV-A75/17red und CDV-hSLAM infizierten Vero-cSLAM- und Vero-hSLAM-Zellen

Der Infektionsverlauf von rekombinalem, wildtypischem CDV-A75/17red auf Vero-cSLAM-Zellen und CDV-hSLAM auf Vero-hSLAM- und Vero-cSLAM-Zellen mit einer MOI von 0,01 wurde über fünf Tage dokumentiert. Die Fluoreszenz des tdTomato-Rot-exprimierenden Virus wurde unter UV-Licht fotomikroskopisch aufgenommen (Balken = 200 µm).

Von den Ansätzen wurden ebenso Virustitrationen auf den jeweiligen SLAM-exprimierenden Vero-Zelllinien in Triplikaten durchgeführt (siehe 3.2.6.1., Abb. 31). Dabei wurden drei unabhängige an hSLAM-adaptierte Viren der dritten Passage verwendet. Die Auswertung der Plaquetests in Duplikaten ergab einen ähnlichen Kurvenverlauf des parentalen CDV-A75/17red auf Vero-cSLAM-Zellen und CDV-hSLAM auf Vero-hSLAM- und Vero-cSLAM-Zellen. Wie die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen von Tag eins bis Tag drei zeigen, ist in diesem Zeitraum in allen Infektionen ein deutlicher Anstieg der Fluoreszenz vorhanden (Abb. 30). So steigt der Titer in allen Proben von Tag eins bei 10^2 pfu/ml auf 4×10^5 pfu/ml an Tag drei in allen Ansätzen an (Abb. 31). An Tag zwei ist in allen Versuchen ein Titer von 2×10^4 pfu/ml vorhanden. An Tag vier und Tag fünf ist der virale Titer von CDV-hSLAM auf Vero-hSLAM-Zellen etwas höher wie der Titer von CDV-A75/17red auf Vero-cSLAM- und Vero-hSLAM-Zellen. Als Kontrolle wurden Vero-hSLAM-Zellen mit dem parentalen CDV-A75/17red unter gleichen Bedingungen infiziert und analysiert. Der resultierende Titer dieser Infektionsversuche ergab einen Titer von maximal 10^2 pfu/ml an Tag zwei über den Zeitraum von fünf Tagen (Abb. 31).

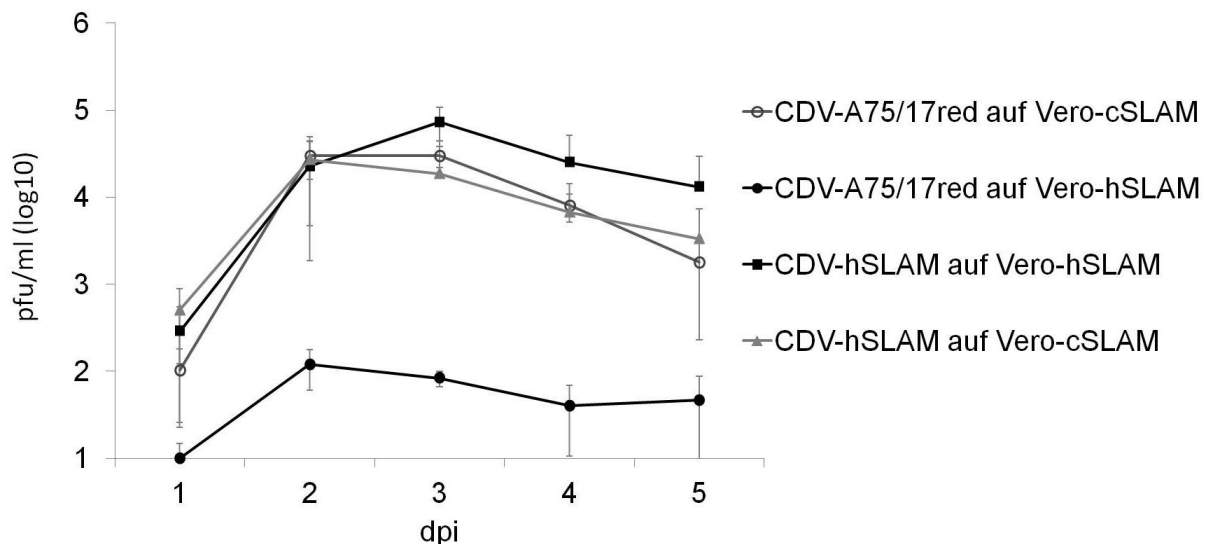


Abbildung 31: Wachstumskurven von CDV-A75/17red und CDV-hSLAM auf SLAM-exprimierenden Vero-Zellen (modifizierte Abbildung nach Bieringer et al. 2013).

Vero-cSLAM-Zellen (leerer Kreis) und Vero-hSLAM-Zellen (gefüllter Kreis) wurden mit CDV-A75/17red und Vero-cSLAM-Zellen (Dreieck) und Vero-hSLAM-Zellen (Quadrat) wurden mit CDV-hSLAM (3. Passage) mit einer MOI von 0,01 infiziert und über einen Zeitraum von fünf Tagen inkubiert. Das zellgebundene und freie Virus wurde zeitabhängig geerntet und isoliert. Die Titrations wurden mittels Plaquetest auf den SLAM spezifischen Vero-Zellen durchgeführt und analysiert (n=3, mit drei unabhängig adaptierten Viren).

4.2.3. Hemmung der CDV-A75/17red-Infektion von SLAM-exprimierenden Zellen mit hSLAM-Antikörper

Um zu testen, ob das CDV-hSLAM spezifisch das SLAM als Rezeptor-vermittelten Eintrittsweg verwendet, wurde das SLAM mit spezifischen Antikörpern markiert und die Infektionsmöglichkeit dieser Zellen untersucht (siehe 3.5.3.). Hierbei wurden die Vero-hSLAM-Zellen vor der Infektion mit verschiedenen Konzentrationen (0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml) an monoklonalem hSLAM-Antikörper (A12, BD Pharmingen) und Antikörper-Isotypkontrolle IgG1κ (Klon MOPC-31C; BD Pharmingen) behandelt, um eine Rezeptorblockade zu induzieren. Es folgte eine Infektion mit CDV-hSLAM, ohne Entfernung des jeweiligen Antikörpers, mit einer MOI von 0,1 für 3 h bei 37°C (siehe 3.5.3.). Fluoreszenzmikroskopische Auswertungen nach zwei Tagen zeigten, dass mit zunehmender hSLAM-Antikörperkonzentration die Rot-fluoreszierenden Zellen abnehmen (Abb. 32). Eine Isotypkontrolle (IgG1κ) zeigt keine Hemmung. Als weitere Kontrolle wurden auch Vero-cSLAM-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an hSLAM-Antikörper (A12, 0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml) behandelt und anschließend mit CDV-A75/17red mit einer MOI von 0,1 infiziert. Nach zwei Tagen zeigte sich keine Inhibition der Infektion dieser Zellen (Abb. 32).

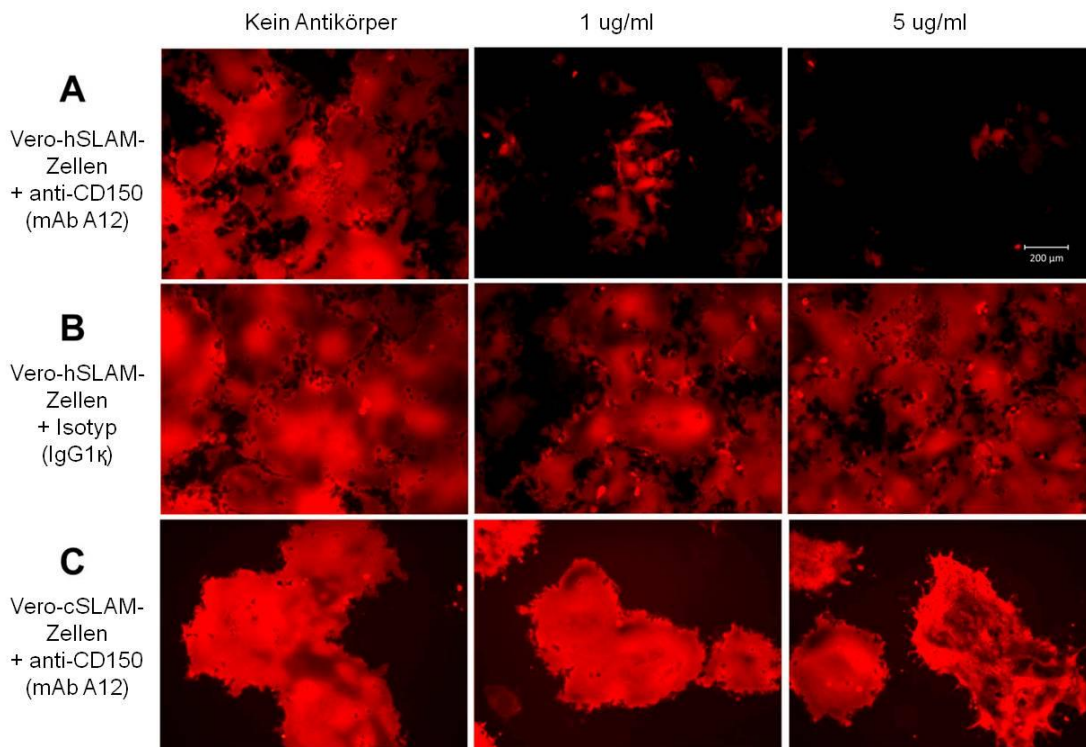


Abbildung 32: Hemmung der CDV-A75/17red-Infektion von SLAM-exprimierenden Zellen mit hSLAM-Antikörper (Bieringer et al. 2013).

Vero-hSLAM-Zellen wurden mit verschiedenen Konzentrationen von spezifischem humanen CD150 Antikörper A12 (A) und isotypischem Antikörper IgG1κ (B) behandelt (0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml). Anschließend wurden die Zellen mit CDV-hSLAM mit einer MOI von 0,1 infiziert. Als weitere Kontrolle wurden Vero-cSLAM-Zellen mit hCD150 Antikörper A12 (0 µg/ml, 1 µg/ml, 5 µg/ml) behandelt und anschließend mit CDV-A75/17red und einer MOI von 0,1 infiziert (C). Die Fluoreszenz des tdTomato-Rot-exprimierenden Virus wurde, nach zwei Tagen, im UV-Licht fotografiert (Balken = 200 µm).

4.2.4. Isolierung einzelner Synzytien und Herstellung von Virusklonen

Für die Herstellung einzelner Virusisolate von CDV-hSLAM wurden Vero-hSLAM-Zellen mit einer Verdünnungsreihe von CDV-hSLAM (3. Passage) infiziert. Die infizierten Zellen wurden mit 2% Agar-Medium Mix (3ml/Napf) überschichtet und für fünf Tage bei 37°C inkubiert (siehe 3.2.6.1.). Nach einer Neutralrotfärbung und Inkubation über Nacht waren die infizierten Plaques deutlich erkennbar. Anschließend wurden zwölf einzelne Synzytien mit einer Pasteurpipette aus der Agar-Medium-Suspension ausgestant und in Medium resuspendiert. Mit diesem virushaltigen Medium wurden wiederum neue Vero-hSLAM Zellen infiziert. Nach drei Tagen Inkubationszeit war eine deutliche Ausbreitung der Rotfluoreszenz und Zunahme der Synzytienbildung in sieben von zwölf Ansätzen zu erkennen. Diese wurden dann bei -80°C gelagert. Das zellgebundene und freie Virus wurde aus den Zellen präpariert und anschließend neue Vero-hSLAM-Zellen (25 cm² Flasche) mit dem gesamten Virusvolumen infiziert. Je nach Fluoreszenzausbreitung konnten diese Virusklone dann ein bis drei Tage nach Infektion geerntet und präpariert werden (siehe 3.2.4.). Es folgte eine erneute Viruszucht mit 200 µl Virusvolumen über einen Zeitraum von zwei Tagen. Die Virusklone wurden geerntet, präpariert und

der jeweilige Titer bestimmt. Die sieben isolierten Virusklone des CDV-hSLAM weisen in der dritten Passage einen durchschnittlichen Titer von 5×10^5 pfu/ml.

4.2.5. Sequenzierung des CDV-hSLAM

Die Sequenzanalysen des CDV-hSLAM-Genoms wurden mit zwei unabhängig adaptierten Viren sowie sieben Virusklonen (siehe 4.2.4.) durchgeführt. Als Referenzsequenz wurde das parentale CDV-A75/17red analysiert und mit der NCBI-Datenbanksequenz CDV-A75/17 (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF164967.1) verglichen. Dazu wurden Vero-hSLAM-Zellen mit den jeweiligen Virusproben mit einer MOI von 0,1 infiziert und für einen Tag inkubiert (siehe 3.2.3.). Es folgte eine RNA-Isolation der infizierten Zellen mit PegGold-Substanz (siehe 3.3.2.2.) und einer RNA-Konzentrationsbestimmung mit dem Spektrophotometer (siehe 3.3.3.). Die isolierte RNA wurde mit einer *M-MLV-reversen-Transkriptase* und random-Primern in cDNA umgeschrieben (siehe 3.3.4.). Anschließend wurde mit spezifischen Primern und einer *Taq-Polymerase* das virale Genom in Fragmenten amplifiziert (siehe 3.3.5.2. und 6.1.). Diese viralen DNA-Fragmente wurden über eine Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt und die spezifischen Banden unter UV-Licht ausgeschnitten (siehe 3.3.1.). Es folgte eine DNA-Gelextraktion mit dem „QIA quick® Gelextraktion Kit“ (siehe 3.3.12.). Die Sequenzierung der Fragmente des CDV-hSLAM-Genoms wurde mit spezifischen Primer in einem Abschnitt von 400 bp durchgeführt (siehe 3.3.11. und 6.1.). Die Auswertung der Sequenzierung wurde mit den Programmen „MegAlign“ und dem Programm „Genedoc“ durchgeführt. In Tabelle 13 sind die Ergebnisse der Auswertung aufgelistet. Im N-Protein sind in den CDV-hSLAM Viren und im parentalen, rekombinanten CDV-A75/17red keine Mutationen im Vergleich zur Datenbanksequenz existent. Im P-Protein ist einer Mutation von S151N sowohl im parentalen als auch in den adaptierten Viren vorhanden. Des Weiteren wurde in allen Proben eine stille Mutation analysiert (2368 nt T-C). Im M-Protein sind in allen Virusproben drei Mutationen von T zu C auf Nukleotidebene (3507 nt, 3515 nt, 3526 nt) anwesend. Dies führt zu einer Y26H und V32A Mutation im M-Protein. Des Weiteren ist eine C zu A Mutation bei Nukleotid 4746 im nicht kodierenden Bereich des M-Gens vorhanden. Diese Position ist im Elektropherogramm des parentalen, rekombinanten CDV-A75/17red gleich stark mit den Nukleotiden C und A vertreten. Im F-Gen ist eine Nukleotidänderung an Position 5366 (T-C) vorhanden. Diese ist eine stille Mutation im F-Protein. Auch im H-Protein ist eine stille Mutation vorhanden (7276 nt A-G). Die Mutation bei Nukleotid 8697 von A zu G ist nur in hSLAM-adaptierten-Viren vorhanden. In dem sequenzierten, parentalen, rekombinanten CDV-A75/17red und in der Datenbanksequenz ist diese Mutation nicht existent. Bei mehrfacher Sequenzierung des parentalen Virus gab es außerdem keine Hinweise im Elektropherogramm, dass diese Mutation an Position 8697 nt schon im Ausgangsmaterial vorhanden sein könnte. Diese Nukleotidänderung impliziert eine Mutation des H-Proteins von D540G. Im L-Gen wurden zwei stille Mutationen in den parentalen und hSLAM-adaptierten Viren detektiert (13772 nt A-G, 14687 nt T-G). Weitere Änderungen im Vergleich zu der

NCBI-Datenbanksequenz (www.ncbi.nlm.nih.gov/nuccore/AF164967.1) wurden auf Nukleotidebene in den nichtkodierenden und intergenischen Regionen der Virusgenome analysiert. Diese sind die eingefügten Schnittstellen *NotI* (1689 – 1696 nt), *PmeI* (3348 – 3355 nt), *BstEII*, *MluI* (7016 – 7021 nt) und einer *BssHII*-Schnittstelle (9024 – 9029 nt). Ein Unterschied in den Mutationen innerhalb der unabhängig, adaptieren CDV-hSLAM-Virus und den entsprechenden Virusklonen war nicht vorhanden.

Tabelle 13: Übersicht über die Mutationen im hSLAM-adaptierten CDV-A75/17red

Die Tabelle zeigt die Mutationen auf Nukleotid- und Aminosäure-Ebene des hSLAM-adaptierten CDV-A75/17red (4. Passage) und des parentalen CDV-A75/17red im Vergleich zu der Datenbanksequenz CDV-A75/17 AF 164.967.1.

Gen	Position (nt)	CDV-hSLAM Mutation in der Nukleotidsequenz *	CDV-hSLAM Mutation in der Aminosäuresequenz *	Mutation im parentaler CDV-A75/17red *
Nukleokapsid (Gen 56-1738 nt; CDS 108-1679 nt)		Keine Mutation	keine Mutation	keine Mutation
Phosphoprotein (Gen 1742-3396 nt; CDS 1801-3324 nt)	1689	A zu G	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	1691	CAGT zu GGCC	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	1696	T zu C	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	2252	G zu A	S151N	S151N
	2368	T zu C	Stille Mutation	Stille Mutation
	3348-3355	AACAGGCA zu GTTAAAC	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	3362	T zu G	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
Matrix (Gen 3400-4846 nt; CDS 34323-4439 nt)	3507	T zu C	Y26H	Y26H
	3515	T zu C	Stille Mutation	stille Mutation
	3526	T zu C	V32A	V32A
	4746	C zu A	Nicht im kodierenden Bereich	C und A gleich stark vorhanden
Fusion (Gen 4850-7055 nt; CDS 4935-6923 nt)	5366	T zu C	Stille Mutation	Stille Mutation
	7014	A zu C	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	7017-7019	GTG zu CGC	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	7021	A zu T	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
Hämagglutinin (Gen 7059-9004 nt; CDS 7079-8902 nt)	7276	A zu G	Stille Mutation	Stille Mutation
	8697	A zu G	D540G	Nicht vorhanden
Polymerase (Gen 9008-15649 nt; CDS 9030-15584 nt)	9024-9028	TTAGT zu GCGCG	Nicht im kodierenden Bereich	Nicht im kodierenden Bereich
	13772	A zu G	Stille Mutation	Stille Mutation
	14687	T zu C	Stille Mutation	Stille Mutation

* Nummerierung und Auswertung nach CDV A75/17 Genbank AF164967.1

4.2.6. Modellanalyse der Interaktion des Hämagglutinin mit dem humanen SLAM (CD150)

Die Struktur und Faltung des MV-H zusammen mit der Bindungsdomäne des hSLAM wurde vor kurzem kristallographisch exakt aufgeklärt (Hashiguchi et al. 2011b). Für das CDV-H Protein wurde dies bis jetzt noch nicht durchgeführt. Aufgrund der starken Homologie von MV-H und CDV-H sowie der insgesamt hohen Übereinstimmung der beiden Morbilliviren, kann die Struktur von MV-H ziemlich genau auf CDV-H übertragen werden. Die Homologiemodellierung wurde mit dem Online-Programm „Phyre“ durchgeführt (Kelley und Sternberg 2009). Mit einem weiteren Programm „3Dligand“ kann die Interaktion des CDV-H-Strukturmodells analysiert werden (Wass et al. 2010). In Abbildung 33 ist das H-Protein des CDV-A75/17red in magenta dargestellt und die Mutation D540G in grün hervorgehoben. In blau ist das hSLAM (CD150; Teile der Domäne 1) dargestellt und die interagierende

Aminosäure E71 in Gelb (Abb. 33). Dieses Strukturmodell zeigt, dass die Mutation D540G in engem Kontakt zu E71 Aminosäure des Rezeptor ist. Beide Ansichten zeigen einen engen Kontakt der beiden Proteine zwischen diesen beiden Aminosäuren (Abb. 33 A und B).

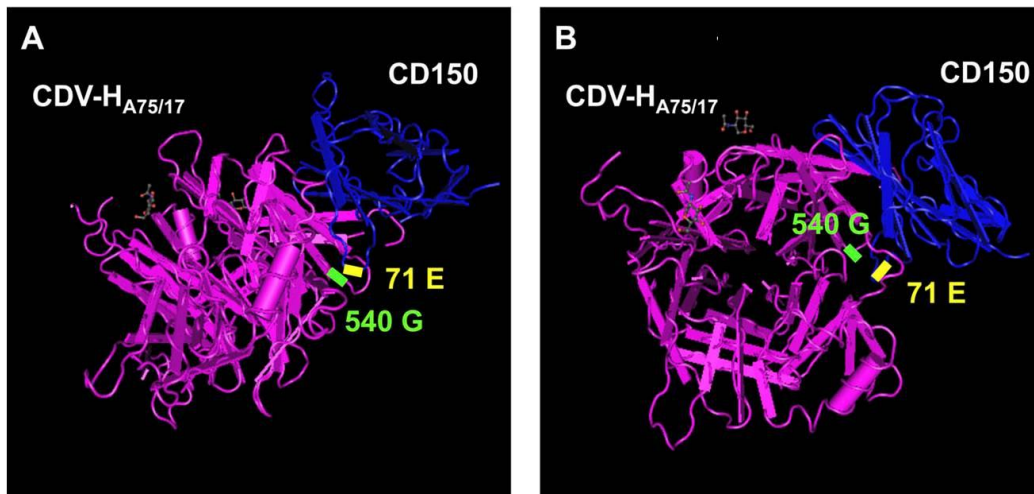


Abbildung 33: Strukturmodell der CDV-H-hCD150 Interaktion (Bieringer et al. 2013)

Die Interaktion der globulären Kopfdomäne des CDV-H (Aminosäure 188-602 in magenta) mit der ersten V-ähnlichen Domäne des humanen CD150 (Aminosäure 32 – 140 in blau) ist in Seitenansicht (A) und der Ansicht von oben (B) gezeigt. Dargestellt ist die Mutation 540 des CDV-H (grün) mit der komplementärer Aminosäure 71 E des humanen CD150 (gelb). Die Strukturmodelle basieren auf der Kristallstruktur des MV-H gebunden an CD150 (Hashiguchi et al. 2011a).

Der Vergleich der hSLAM- mit der cSLAM-Proteinsequenz zeigte eine hohe Übereinstimmung im Aminosäurebereich 61 bis 131 (Abb. 34). Die Aminosäuren 70 und 71 interagieren hierbei mit dem Hämagglutinin der Morbilliviren, wie in Abbildung 33 zu erkennen ist. Durch die Faltung des H-Proteins wird die D540G-Mutation im CDV-hSLAM mit diesen beiden Aminosäuren des Rezeptors in eine räumliche Nähe gebracht. Wie aus Abbildung 34 ersichtlich, befindet sich im cSLAM ein ungeladenes Glycin an Position 71, wohingegen sich bei dem humanen SLAM ein negativ geladener Glutamatrest befindet.

		60		71		80		100
dog CD150	GISKRMNKS	IHLVTRAESP	GNS	SIKKKIVSLDL	PEGGSPRYLENGYKFHL			
	I+K	MNKS	IHI+VT	A+S	NS++	KIVSLD	E G	PRYL + YKF+L
human CD150	RINKSMNKS	IHVVTMAKSL	ENSVENKIVSLD	PSEAGPPRYLGDRYKFYL				
			120			140		
dog CD150	ENLTLRILES	RRENEGWFMTLEEN	FSVQHFCLQLKLYEQVSTPEIKVLN					
	ENLTL	I ESR+E+EGWY	MTLE+N	SVQ	FCLQL+LYEQVSTPEIKVLN			
human CD150	ENLTLGIRES	RKEDEGWYLMTLEKNVSVQRFCLQLRLYEQVSTPEIKVLN						

Abbildung 34: Vergleich der caninen und humanen CD150-Sequenz in dem Morbillivirus H-bindenden Bereich (Bieringer et al. 2013).

Der MV-H bindende Bereich des CD150 (SLAM) wurde zwischen Aminosäure 61 und 131 analysiert. Im cSLAM (dog CD150) ist die Aminosäure 71 ein ungeladenes G und im humanen CD150 ein negativ geladenes E (NM_001003084, Hashiguchi et al. 2011a).

4.3. Virusvermehrung von CDV-A75/17red, CDV-hSLAM und MV-IC323eGFP auf humanen B-Lymphozyten Zelllinien

Bis jetzt konnte gezeigt werden, dass eine Adaptierung des CDV-A75/17red an das Nektin4 nicht notwendig ist und an das humane SLAM innerhalb von drei Passagen sehr schnell und effizient funktioniert (siehe 4.1. und 4.2.). B-Lymphozyten exprimieren das SLAM an der Zelloberfläche und können speziesspezifisch von Morbilliviren infiziert werden (Aversa et al. 1997, Tatsuo et al. 2000, Yanagi et al. 2006). Zusätzlich besitzen diese, im Vergleich zu den vorher verwendeten Vero-Zelllinien, ein intaktes Interferonsystem und können damit eine Virusinfektion hemmen. Eine Wachstumskinetik soll zeigen, wie sich die Viren MV-IC323eGFP, parentales CDV-A75/17red und adaptiertes CDV-hSLAM über einen Zeitraum von fünf Tagen auf den B-Lymphozyten vermehren kann. Anhand von Titeranalysen kann eine Aussage über die Infektions- und Replikationseffizienz der einzelnen Virusstämme getroffen werden. Für diese Versuche wurden BJAB-, Raji- und Raji-DC-SIGN-Zellen verwendet. Alle Zelllinien exprimieren das SLAM auf ihrer Oberfläche (Tatsuo et al. 2000, Witte et al. 2006). Die Raji-DC-SIGN-Zellen wurden mit dem DC-SIGN-Konstrukt (C-type lectin DC-specific intercellular adhesion molecule 3-grabbing nonintegrin) transfiziert und exprimieren diesen Rezeptor zusätzlich an ihrer Oberfläche (Witte et al. 2006).

Die Infektionseffizienz und die Virusvermehrung von CDV-A75/17red, CDV-hSLAM und MV-IC323eGFP auf B-Lymphozyten, wurden in unabhängigen Triplikaten anhand der Zelllinien BJAB-, Raji- und Raji-DC-SIGN-Zellen untersucht. Dazu wurden $1,5 \times 10^6$ Zellen in 5 ml 10% FCS-haltigem RPMI-1640 Medium mit einer MOI von 0,01 infiziert und im 37°C-Brutschrank inkubiert (siehe 3.2.2.2.). Nach zwei Tagen erfolgte eine Zugabe von 5 ml 10% FCS-haltigem RPMI-1640 Medium. Die infizierten Zellen wurden täglich in 1 ml Medium geerntet und das Virus aus den Zellen präpariert (siehe 3.2.4.). Der virale Titer der Viruspräparation konnte mittels Plaquetest bestimmt werden (siehe 3.2.6.1.). Hierfür wurde die Viruspräparation von CDV-A75/17red-infizierten B-Lymphozyten auf Vero-cSLAM-Zellen titriert und die Viruspräparationen von CDV-hSLAM- und MV-IC323eGFP-infizierten B-Lymphozyten auf Vero-hSLAM-Zellen, in Duplikaten, titriert.

Die Abbildung 35 zeigt die resultierenden Titer von CDV-A75/17red auf den BJAB-, Raji- und Raji-DC-SIGN-Zellen über fünf Tage an. Die Virusvermehrung von CDV-A75/17red auf BJAB- und Raji-Zellen zeigt keinen viralen Titer über den gesamten Zeitraum. Die Infektion von Raji-DC-SIGN-Zellen zeigt einen sehr geringen viralen Titer von maximal 15 pfu/ml an Tag zwei. An den folgenden Tagen ist eine Abnahme des viralen Titers messbar.

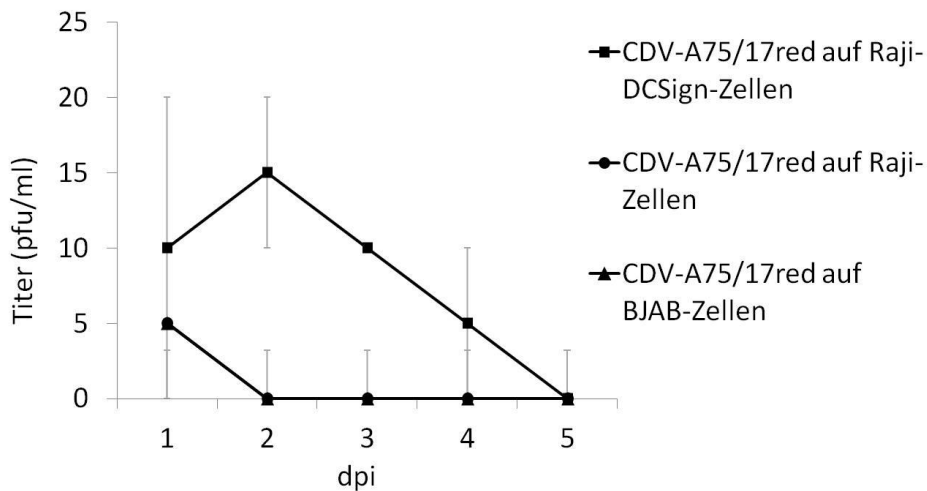


Abbildung 35: Wachstumskurven von CDV-A75/17red auf B-Lymphozyten Zelllinien

Raji-DC-SIGN-(Quadrat), Raji- (Kreis) und BJAB-Zellen (Dreieck) wurden mit CDV-A75/17red mit einer MOI von 0,01 infiziert und über einen Zeitraum von fünf Tagen inkubiert. Das zellgebundene und freie Virus wurde zeitabhängig geerntet und isoliert. Die Titrations wurden mittels Plaquetest auf den Vero-cSLAM-Zellen durchgeführt und analysiert (n=3).

Als Vergleich, zu der Virusvermehrung des CDV-A75/17red auf humanen B-Lymphozyten, wurde die Virusvermehrung von MV-IC323eGFP auf BJAB-, Raji- und Raji-DC-SIGN-Zellen, unter gleichen Bedingungen, untersucht. Hierfür wurde der virale Titer des zellgebundenen und freien Virus mittels Plaquetest auf Vero-hSLAM-Zellen bestimmt. Die Abbildung 36 zeigt in allen verwendeten Zelllinien eine Zunahme des viralen Titers über fünf Tage. Des Weiteren ist die Infektion von Raji-DC-SIGN-Zellen, im Vergleich zu Raji-Zellen, stärker und der virale Titer höher. Die Infektion von BJAB Zellen steigt über diese fünf Tage stetig an. Im Gegensatz dazu erreicht der virale Titer von infizierten Raji- und Raji-DC-SIGN-Zellen an Tag drei seinen Höhepunkt.

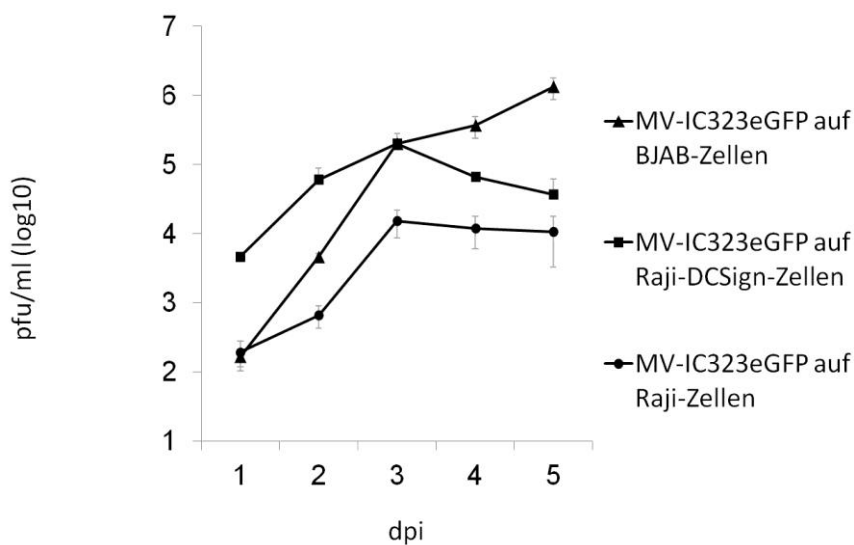


Abbildung 36: Wachstumskurven von MV-IC323eGFP auf B-Lymphozyten Zelllinien

BJAB- (Dreieck), Raji-DC-SIGN- (Quadrat), Raji-Zellen (Kreis) wurden mit MV-IC323eGFP mit einer MOI von 0,01 infiziert und über einen Zeitraum von fünf Tagen inkubiert. Das zellgebundene und freie Virus wurde zeitabhängig geerntet und isoliert. Die Titrations wurden mittels Plaquetest auf den Vero-hSLAM-Zellen durchgeführt und analysiert (n=3).

Die Abbildung 37 zeigt die resultierenden Titer von CDV-hSLAM auf Raji- und Raji-DC-SIGN-Zellen an. In Abbildung 35 ist der Infektionsverlauf von parentalen CDV-A75/17red auf BJAB- und Raji-Zellen zu sehen, wobei sich kein Unterschied im viralen Titer zwischen den beiden Zelllinien zeigte. Deswegen wurde in der CDV-hSLAM- Wachstumskurve die Zelllinie BJAB vernachlässigt. Die Abbildung 37 zeigt einen Anstieg im viralen Titer von Tag eins bis Tag drei in beiden Zelllinien. Der maximal erreichte Titer an Tag drei ist hierbei ebenso in beiden Zelllinien identisch. In den folgenden Tagen ist ein deutlicher Abfall des viralen Titers detektierbar.

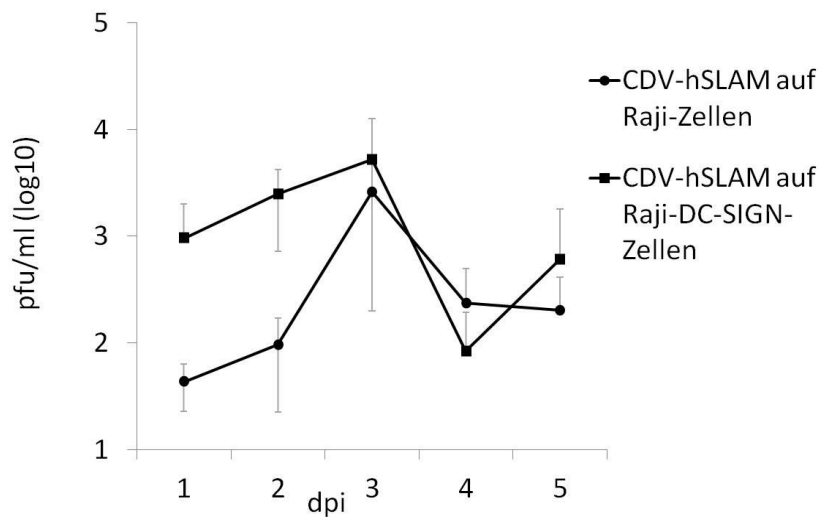


Abbildung 37: Wachstumskurven von CDV-hSLAM auf B-Lymphozyten Zelllinien

Raji-DC-SIGN- (Quadrat), Raji- (Kreis) wurden mit CDV-hSLAM mit einer MOI von 0,01 infiziert und über einen Zeitraum von fünf Tagen inkubiert. Das zellgebundene und freie Virus wurde zeitabhängig geerntet und isoliert. Die Titrations wurden mittels Plaquetest auf den Vero-hSLAM-Zellen durchgeführt und analysiert (n=3).

5. Diskussion

5.1. Adaptierung von rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red an humanes Nectin4

5.1.1. Verwendung des Nectin4 als Virusrezeptor

Die Adaptierung des CDV-A75/17red wurde in einem ersten Versuch an die epitheliale Zelllinie H358 durchgeführt (siehe 1.5., Han J. W. 2010, Bieringer et al. 2013). Dieser Versuch zeigte eine signifikante initiale Infektion und eine schnelle Adaptierung von CDV-A75/17red an die humane H358-Zelllinie innerhalb weniger Passagen (Abb. 11). Auch die Titerbestimmung der einzelnen Viruspassagen ergab eine deutliche Zunahme an infektiösen Viruspartikeln korrelierend mit zunehmender Viruspassage (Abb. 13A). Dies lässt vermuten, dass nur wenige Mutationen im CDV-Genom notwendig sind, um eine effektive virale Infektion und Replikation in humanen Epithelzellen zu ermöglichen. Die Adaptierung an H358-Zellen wurde außerdem auch von Otsuki und Kollegen mit den CDV-Stämmen Ac96I, 82Con, 55L, M24Cr und Th12 untersucht und ähnliche Ergebnisse erzielt (Otsuki et al. 2013b).

Zu Beginn dieser Arbeit war nur bekannt, dass sich Epithelzellen mit MV rezeptorspezifisch infizieren lassen, welches Protein jedoch als epithelialer Rezeptor (EpR) fungiert war damals noch nicht bekannt (Takeda et al. 2007). Erst im Verlauf dieser Doktorarbeit wurde Nectin4 als EpR für Morbilliviren identifiziert (Mühlebach et al. 2011, Noyce et al. 2011, Noyce et al. 2013). Aus diesem Grund wurde in dieser Arbeit die Oberflächenexpression von Nectin4 auf den H358-Zellen mittels Immunfluoreszenzmikroskopie und Durchflusszytometrie analysiert. Es zeigte sich, dass diese Zelllinie das humane Nectin4 auf der Oberfläche exprimiert (Abb. 14) und damit dieses Protein als möglicher Rezeptor für die Virusaufnahme zur Verfügung steht. In Abbildung 15 ist eine MV-Infektion von H358-Zellen mit der MV-typischen Synzytienbildung zu sehen. Da die Virusaufnahme in geringem Maße jedoch auch über andere unbekannte Rezeptoren oder eventuell durch unspezifische Interaktion mit Rezeptoren ausgelöste Membranfusion erfolgen könnte, wurde die CDV-Infektion von H358-Zellen genauer analysiert. Um zu bestätigen, dass es sich bei der Adaptierung von CDV-A75/17red an H358-Zellen, um eine Nectin4-spezifische Rezeptorbindung handelt, wurden die Zellen vor Infektion mit monoklonalem Nectin4-Antikörper inkubiert (Abb. 16). Dieser Test zeigt, dass das CDV-H358 das humane Nectin4 als spezifischen Eintrittsrezeptor verwendet, da mit zunehmender Nectin4-Antikörperkonzentration die CDV-Infektion abnimmt (Abb. 16). Identisch zu H358-Zellen ohne Antikörperbehandlung, zeigte die Isotypkontrolle in keiner der verwendeten Konzentrationen eine Veränderung in der CDV-H358-Infektionsfähigkeit. Folglich wird durch die Blockade des Nectin4-Rezeptors in den H358-Zellen konzentrationsabhängig die Infektion mit CDV-H358 gehemmt. Durch diesen Versuch konnte gezeigt werden, dass Nectin4 der Eintrittsrezeptor von CDV-H358 in die H358-Zellen ist. Parallel zeigten weitere Gruppen, dass auch die Infektion von Vero-cN4-Zellen mit CDV-5804PeH und CDV-Ac96I mit einem polyklonalen humanen Nectin4-Antikörper konzentrationsabhängig gehemmt werden

kann (Pratakipriya et al. 2012, Noyce et al. 2013). Des Weiteren belegte Noyce und Kollegen auch, dass die Nectin4-Oberflächenexpression auf Zellen mit Nectin4-spezifischer siRNA-reduziert werden kann und damit die CDV-Infizierbarkeit der Zelllinie vermindert ist (Noyce et al. 2013). Diese Arbeiten belegen deutlich, dass das CDV Nectin4 für die Aufnahme in die Zellen verwendet. Es stellt sich die Frage, ob dafür eine Adaptation, also eine molekulare Veränderung des CDV-H-Proteins notwendig ist.

5.1.2. Anpassung des CDV-A75/17red an die H358-Zelllinie auf Genomebene

Bei der Infektion von H358-Zellen mit CDV-A75/17red erfolgte innerhalb weniger Passagen eine Optimierung (siehe 1.5., Han J. W. 2010). Dies lässt vermuten, dass nur geringe molekulare Veränderungen des Virusgenoms und der viralen Proteine nötig waren, um diese Wirtszelle infizieren zu können. Deswegen wurde für die Mutationsanalysen sowohl das parentale CDV-A75/17red-Genom als auch das CDV-H358-Genom (4. Passage) sequenziert (siehe 4.1.3.).

Die Sequenzanalyse des CDV-H358 ergab, im Vergleich zum parentalen Virus, keine Mutation im F- und H-Protein (Tab. 11). Dies zeigt, dass für die Aufnahme des Virus in die H358-Zelle keine weitere Anpassung nötig ist, wie auch in der vorrausgegangenen Diplomarbeit schon vermutet wurde (Han J. W. 2010). Dies wird auch durch die Wachstumskinetik von CDV-A75/17red auf Vero-cN4-4TS-Zellen und Vero-hN4-Zellen bestätigt. Diese zeigen, dass das CDV sowohl canines Nectin4 als auch humanes Nectin4 verwenden kann (siehe 4.1.5.). Sowohl in den Immunfluoreszenzbildern, als auch in den Titeranalysen ist kein bedeutender Unterschied zwischen der Virusvermehrung auf cN4- und hN4-exprimierenden Vero-Zelllinien zu erkennen (Abb. 22 und 23). Auch Otsuki und Kollegen zeigten, dass der resultierende virale Titer von CDV-Ac96I auf Nectin4-exprimierenden Zellen an den jeweiligen Tagen gleich ist (Otsuki et al. 2013b). Auch in diesem CDV-Stamm ist keine Mutation im H-Protein infolge der H358-Passagierung vorhanden (Otsuki et al. 2013b).

Weitere Mutationen in anderen Genen des CDV-H358 könnten als Adaptation an intrinsische Faktoren und die angeborenen Immunantwort entstehen und die Infektion verbessern. MV-RNA und vermutlich auch Morbillivirus RNA generell wird in humanen Zellen von RIG-1 und mda5 erkannt und induziert eine Interferonantwort (Ikegame et al. 2010). Die viralen Proteine P, V, und C können hingegen die zelluläre Typ I und Typ II Interferonantwort, durch unterschiedliche Interaktion mit dem JAK/STAT-Signalweg, blockieren (Nakatsu et al. 2008, Röthlisberger et al. 2010), (Devaux et al. 2013, Chinnakannan et al. 2013). Dadurch kann die zelluläre Immunantwort gegen das Virus unterdrückt und die antiviralen Funktionen der Zelle gehemmt werden. Aus diesem Grund wird vermutet, dass insbesondere in diesen P/V/C-Genen funktionelle Mutationen auftreten, welche den Spezieswechsel und damit die speziesspezifische Immunantwort kompensieren können. In den Analysen

des CDV-H358 konnten zwei Mutationen im P-Protein gefunden werden (A45V und Q102L, Tab. 11). Für MV wurde gezeigt, dass durch eine Deletion des C-Proteins oder durch eine Verkürzung des C-Proteins bei Aminosäure 157 es zu einer übermäßigen Replikation der viralen RNA kommt und dadurch das Wirtsinterferonsystem stärker aktiviert werden kann (Nakatsu et al. 2008). Auch für CDV wurde gezeigt, dass das intakte C-Protein eine bedeutende Rolle für die Infektion und Replikation in humanen Epithelzellen spielt (Otsuki et al. 2013b). Damit kann sowohl das intakte C-Protein des MV als auch des CDV mittels der Regulation der viralen RNA-Synthese die Wirtsinterferonantwort steuern (Nakatsu et al. 2008, Otsuki et al. 2013b). Aber nicht jeder CDV-Stamm mit einem intakten C-Protein kann in H358-Zellen replizieren. Auch das V-Protein beeinflusst die virale Replikation in diesen Zellen. Das V-Protein des CDV-007Lm mit einem Cystein an Position 267 kann, im Gegensatz zu einem Tyrosin an dieser Position, den Interferon-stimulierenden Signalweg blockieren und damit die Replikation in den Zellen verbessern, obwohl es ein intaktes C-Protein besitzt (Otsuki et al. 2013a).

Des Weiteren können auch Mutationen im N- und M-Gen, die die Infektions- und Replikationseffizienz von CDV in H358-Zellen begünstigen, auftreten (Otsuki et al. 2013b). So tragen z.B. bestimmte Mutationen im MV-M-Protein zum Viruswachstum in unnatürlichen Wirtszellen bei (Miyajima et al. 2004, Dong et al. 2009). In dieser Genomanalyse von CDV-H358 konnte jedoch keine Mutation gefunden werden.

Im L-Protein wurden weitere mögliche Veränderungen entdeckt, welche einen Einfluss auf die Replikation des Virus haben könnten (D599N, N1775S, T1778A). Im Elektropherogramm sind diese Mutationen nicht eindeutig, weswegen noch weitere Sequenzierungen des an H358-adaptierten Virus durchgeführt werden müssen, um eine exakte Aussage der notwendigen Mutationen treffen zu können. Zusätzlich wurden, im Vergleich zu wildtypischem CDV-A75/17, die erwarteten Mutationen gefunden, die für die Herstellung des rekombinanten tdTomato-Rot exprimierenden Virus, basierend auf dem Plasmid pA75/17-V3, zur Erzeugung von Restriktionsenzymstellen benötigt und eingefügt wurden (Abb. 38, Plattet et al. 2004). Auch das rekombinante, wildtypische CDV-A75/17 kodierend für das eGFP (CDV-A75/17eGFP) wurde mit Hilfe des pA75/17-V3-Konstrukts hergestellt (Abb. 38). Dieses Virus zeigt zusätzlich zu den inserierten Restriktionsschnittstellen, weitere vier stille Mutationen im F-Gen (5366 nt T-C), H-Gen (7267 nt A-G) und L-Gen (13772 nt A-G und 14687 nt T-C) auf. In den Sequenzanalysen des CDV-H358-Genoms und des CDV-A75/17red-Genoms, wurden diese Mutationen ebenso detektiert. Auch die beiden Mutationen im nichtkodierenden Bereich des P-Gens (3362 nt T-G) und des F-Gens (7014 nt A-C) sind identisch (Plattet et al. 2004). Vermutlich handelt es sich bei diesen Mutationen um eine Anpassung an die Vero-Zelllinie.

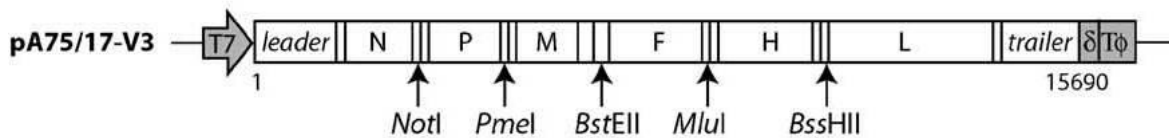


Abbildung 38 : Klonierungsstrategie des rekombinanten CDV-A75/17 (modifizierte Abbildung nach Plattet et al. 2004)

Das wildtypische, rekombinante CDV-A75/17red stammt aus dem Plasmid pA75/17-V3 ab. Die Restriktionsschnittstellen *NotI*, *PmeI*, *BstEII*, *MluI* und *BssHII* ermöglichen verschiedene Klonierungsstrategien. Das CDV-A75/17red kodiert für ein tdTomato-Gen zwischen dem M- und F-Gen (*BstEII*-Schnittstelle).

Aufgrund der ausgewählten Methodik kann es zu einer Selektion der viralen RNA kommen, da die virale RNA mittels Random-Primern in cDNA transkribiert wurde und dann mit spezifischen Primern Sequenzierungsfragmente amplifiziert wurden. Des Weiteren wurde auch mit ausgewählten Primern sequenziert, und damit eventuell nochmals ein Selektionsdruck auf die Proben ausgeübt. Um dies zu verhindern, müsste man verschiedene Primerpaare für ein Sequenzierungsfragment verwenden und die Sequenzierung in beide Richtungen durchführen. Auch eine Isolation und Sequenzierung von einzelnen Synzytien wäre denkbar. Um die Funktionalität der Mutationen überprüfen zu können, müsste man rekombinante Viren mit den jeweiligen Mutationen generieren und diese auf Infektions- und Replikationseffizienz überprüfen.

Zusammenfassend ist keine Mutation in dem F- und H-Protein für die Bindung an humanes Nectin4 notwendig. Folglich interagiert das humane Nectin4 spezifisch mit den wildtypischen CDV-Hüllproteinen, induziert die benötigten Konformationsänderungen des Hüllproteinkomplexes und unterstützt die F-Protein-induzierte Membranfusion des viralen Kapsids mit der Zellmembran. Damit gibt es auf dieser Ebene keine Speziesbarriere. Insbesondere die im P-Gen gefundenen Mutationen könnten die beobachtete Adaptation des wildtypischen Virus an die humanen H358-Zellen reflektieren.

5.1.3. Speziesunabhängige Nectin4 Verwendung von CDV-A75/17red und MV-IC323eGFP

Speziesspezifische Nectin4-exprimierende Zelllinien wurden basierend auf der Vero-Zelllinie generiert. Diese Zelllinie besitzt ein defizientes Interferonsystem und kann dadurch als geeignetes Modell für virale Infektionsversuche verwendet werden (Emeny und Morgan 1979, Mosca und Pitha 1986, Chew et al. 2009). Die konstruierten Zelllinien zeigen eine deutliche Expression des speziesspezifischen Nectin4 an der Zelloberfläche und weisen keine Veränderung in der Zellmorphologie und Proliferationsrate auf (Abb. 19 und 20). Auch die fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Wachstumskurven von CDV-A75/17red belegen eine ähnliche Ausbreitung und Synzytienbildung von Vero-cN4-4TS- und Vero-hN4-Zellen über einen Zeitraum von fünf Tagen (Abb. 22). Auch Noyce und Kollegen belegen, dass

auch das CDV-580-PeH sowohl Zellen mit caninem als auch mit humanem Nectin4 infizieren kann und es zur Synzytienbildung kommt (Noyce et al. 2013). Die Wachstumskurve von CDV-A75/17red auf Vero-Zellen belegt, dass es sich bei den oben erwähnten Wachstumskurven um eine Nectin4-vermittelte Virusaufnahme handeln muss (Abb. 22C). Obwohl die Infektion von Vero-cN4-4TS-Zellen in einem besseren Virustiter resultiert, steigt die Virusaufnahme und Replikation in beiden Zelllinien ähnlich effizient (Abb. 23). Die Abnahme des Virustiters an Tag vier und fünf ist bedingt durch das Zellsterben, infolge des langen Inkubationszeitraumes und der negativen Einflüsse der Virusinfektion auf das Zellwachstum. Die Kontrolle, parentale Vero-Zellen infiziert mit CDV-A75/17red, zeigte über einen Zeitraum von fünf Tagen Titerwerte unter 10^1 pfu/ml (Abb. 23). Die Virusaufnahme erfolgt hierbei ohne spezifischen Rezeptor (Noyce und Richardson 2012). Dadurch ist bei der Infektion von Vero-Zellen mit CDV kaum Synzytienbildung zu erkennen und auch bei MV-Infektion von Vero-Zellen wurden nur Einzelzellinfektionen beobachtet (Hashimoto et al. 2002). Auch die Infektion von Vero-cN4- und Vero-hN4-Zellen mit CDV-Ac96I, CDV-2Con, CDV-55L, CDV-M24Cr und CDV-Th12 ist belegt (Otsuki et al. 2013b). Dadurch wird ersichtlich, dass das CDV sowohl das canine Nectin4 als auch das humane Nectin4 als Eintrittsrezeptor verwenden kann.

Auch die Wachstumskinetik von MV-IC323eGFP auf Nectin4-exprimierenden Zellen zeigt keinen Unterschied in der Verwendung von caninem Nectin4 oder humanem Nectin4. Es wurde wie bei Mühlebach und Kollegen beobachtet, dass im Vergleich zu einer Wachstumskinetik von MV-IC323eGFP auf Vero-hSLAM-Zellen diese langsamer verläuft (Mühlebach et al. 2011). Außerdem lässt dies die Vermutung zu, dass auch das MV sowohl das humane Nectin4 als auch das canine Nectin4 ohne weitere Anpassung verwenden kann.

Ein Vergleich von caninen und humanen Nectin4 zeigt eine hohe Sequenzidentität von 90% auf. So belegten Noyce und Kollegen eine Übereinstimmung von 94,3% (Labrador Retriever) bzw. 89,9% (MDCK, Cocker Spaniel) mit humanem Nectin4 auf Aminosäureebene (Noyce et al. 2013). Eine andere Analyse ergab sechs Mutationen zwischen dem caninen und humanen Nectin4 Rezeptor (Otsuki et al. 2013b). Des Weiteren konnte gezeigt werden, dass sich die, für die Virusbindung notwendige V-Domäne des Nectin4 zwischen Hund und Mensch in nur drei Aminosäuren unterscheidet (A13P, P92A, N106S, Noyce et al. 2013). Außerdem zeigte die Verwendung des monoklonalen humanen Nectin4-Antikörpers (MAB2658) eine deutliche Interaktion mit dem caninen Nectin4 (Abb. 20). Damit kann die Epitoperkennung dieses Antikörpers (Gly27 – Val 351) nicht zwischen den beiden Spezies unterscheiden, was nahelegt, dass beide Proteine, speziell in diesem Bereich, hoch konserviert sind. Damit ist eine hohe Homologie des Nectin4 beider Spezies belegt.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass CDV ohne Mutation in den Hüllproteinen das humane Nectin4 als Eintrittsrezeptor verwenden kann. Ebenso kann MV canines Nectin4-exprimierende Vero-Zellen infizieren. Damit wird die Speziesbarriere zwischen Hund und Mensch nicht mittels des epithelialen Rezeptors

definiert und andere intrinsische Faktoren spielen eine weitaus bedeutendere Rolle im Adaptierungsprozess von CDV an humane Zellen.

5.2. Adaptierung von wildtypischem, rekombinantem CDV-A75/17red an das humane SLAM

5.2.1. Effiziente Adaptierung von CDV-A75/17red an Vero-hSLAM-Zellen

CD150 (SLAM) wird von allen Morbilliviren als Rezeptor verwendet und dient als Haupteintrittsweg in die Wirtszelle (Tatsuo et al. 2001). Dabei verwendet jedes Morbillivirus das speziesspezifische SLAM. Für die Adaptierung von wildtypischem, rekombinantem CDV-A75/17red an das hSLAM wurde die Zelllinie Vero-hSLAM verwendet, da Vero-Zellen einen Defekt in der Interferonproduktion haben, was die Infektion unabhängig vom Interferonsystem macht (siehe 1.5., Emeny und Morgan 1979, Mosca und Pitha 1986, Chew et al. 2009). Die Oberflächenexposition des hSLAM wurde mittels Durchflusszytometrie bestätigt (Abb. 25 und 26) und zeigt des Weiteren, dass beide verwendeten Antikörper spezifisch für das hSLAM sind. Wie in Abbildung 27 zu sehen ist, können Vero-hSLAM-Zellen mit dem MV-IC323eGFP und Vero-cSLAM-Zellen mit CDV-A75/17red infiziert werden.

Wie aus der Diplomarbeit von Jung Woo Han und meinen Arbeiten hervorgeht, ist die Adaptierung von CDV-A57/17red an das hSLAM in wenigen Passagen möglich (siehe 1.5., Abb. 12). In der vorliegenden Doktorarbeit wurde die Adaptierung von CDV-A75/17red an Vero-hSLAM-Zellen in drei unabhängigen Versuchen wiederholt (siehe 4.2.1.) Die Versuche zeigten, dass innerhalb von drei Passagen eine schnelle und effiziente Anpassung des Virus an das hSLAM reproduzierbar stattfindet. Die Abbildung 28 zeigt von der ersten zur zweiten Passage eine Zunahme der Infektion und Synzytienbildung nach gleicher Inkubationsdauer. Obwohl in der zweiten Passage eine 100-fach geringere MOI verwendet wurde. Die Titeranalysen deuten außerdem einen Anstieg an infektiösen, viralen Partikeln von der ersten zur dritten Passage an (Abb. 29). In den weiteren Passagen ist der Titer konstant. Dies bestätigt die Anpassung an das SLAM und die Reinfektion der Zellen. Die Verwendung von Vero-cSLAM-Zellen und Vero-hSLAM-Zellen für den Plaquetest zeigt nur für die erste Passage des CDV-hSLAM einen Unterschied im resultierenden Titer. Dabei ist der Titer auf Vero-cSLAM-Zellen etwa um das 10-fache erhöht, als im Vergleich auf Vero-hSLAM-Zellen. Das bedeutet, dass schon ab der zweiten Viruspassage das CDV-hSLAM nicht mehr zwischen den unterschiedlichen Spezies des SLAM unterscheidet.

5.2.2. Speziesunabhängige SLAM Verwendung von CDV-hSLAM

Die Wachstumskurven auf den speziesspezifischen SLAM-exprimierenden Vero-Zellen belegen eine sehr effiziente Adaptierung des rekombinanten CDV-A75/17red an das hSLAM. Diese zeigen außerdem, dass das an hSLAM-adaptierte CDV-A75/17red ebenso das cSLAM weiterhin als Eintrittsrezeptor verwenden kann und sich in diesen Zellen weiterhin effizient repliziert (Abb. 31). Die Virusvermehrung des parentalen CDV-A75/17red auf Vero-cSLAM-Zellen zeigt hierzu identische Titerwerte über fünf Tage. Folglich ist die virale Infektion und Replikation des CDV-hSLAM auf Vero-hSLAM- und Vero-cSLAM-Zellen sehr effizient und korreliert mit der des parentalen Virus. Ein anderer an hSLAM-adaptierter CDV-Stamm (CYN07-hV) zeigt vergleichbare Daten und kann ebenso beide Speziesrezeptoren verwenden (Sakai et al. 2013). Dieser Befund wurde auch in den Titeranalysen des Adaptierungsprozesses beobachtet. So war ab der zweiten Passage der Titer des CDV-hSLAM auf beiden, für die Titration verwendeten Zelllinien, Vero-hSLAM und Vero-cSLAM, identisch. Außerdem zeigen die Wachstumskurven innerhalb der ersten drei Tage eine Zunahme der Synzytien und ein Anstieg des viralen Titers (Abb. 30 und 31). An Tag vier und fünf nach Infektion war ein leichter Rückgang der Titer, aufgrund von stark infizierten Zellen und Synzytien, welche sich vom Flaschenboden ablösen und damit für die Titerbestimmung verloren gehen, zu sehen (Abb. 28).

5.2.3. Verwendung von humanen SLAM als Virusrezeptor

Da sich das CDV durch den Adaptationsprozess auch an einen unbekanntem Rezeptor hätte adaptieren können, musste bestätigt werden, dass es sich tatsächlich um eine spezifische Adaptation an den hSLAM Rezeptor handelte. Hierzu wurden Vero-hSLAM-Zellen mit verschiedenen Konzentrationen an hSLAM-Antikörpern (CD150, A12) inkubiert und anschließend mit CDV-hSLAM infiziert. Es zeigt sich mit zunehmender hSLAM-Antikörperkonzentration eine Hemmung der CDV-Infektion (Abb. 32A). Eine Isotypkontrolle belegt, dass die Infektion nicht unspezifisch durch Antikörper inhibiert wird, sondern durch die spezifische Blockade des SLAM initiiert wird (Abb. 32B). Dies belegt, dass das CDV-hSLAM das hSLAM spezifisch als Eintrittsweg in die Zelle verwendet. Als Kontrolle wurden auch Vero-cSLAM-Zellen vor der Infektion mit parentalem CDV-A75/17red mit dem hSLAM-Antikörper behandelt (Abb. 32C). Diese Infektion wird mit zunehmender hSLAM-Antikörperkonzentration nicht gehemmt, da der Antikörper human-spezifisches Epitop auf hSLAM erkennt. Dies konnte auch in den durchflusszytometrischen Analysen bestätigt werden (Abb. 25 und 26). Der Sequenzvergleich von hSLAM und cSLAM zeigt, dass die Rezeptoren in 64% Sequenzidentität auf Aminosäureebene haben (Tatsuo et al. 2001).

5.2.4. Anpassung des CDV-A75/17red an Vero-hSLAM auf Genomebene

Die Sequenzanalysen wurden mit drei unabhängigen CDV-Adaptierungen an hSLAM und sieben Virusklonen durchgeführt, wobei in den Genen der beiden Hüllproteine F und H jeweils nur eine Mutation gefunden wurde. Im F-Gen war dies eine stille Mutation (5366 nt T-C) im Vergleich zu der Datenbanksequenz (CDV-A75/17 AF164.967.1), sowohl in den adaptierten CDV-hSLAM als auch im parentalen CDV-A75/17red. Im H-Gen des CDV-hSLAM war dies eine Mutation in der rezeptorbindenden Domäne des CDV-hSLAM-H-Proteins (D540G, Abb. 39). In der Nukleotidsequenz ist dies ein A zu G Austausch an Position 8697. Im parentalen CDV-A75/17red-H-Protein, wie veröffentlicht in der Datenbanksequenz (CDV-A75/17 AF164.967.1), und nach eigenen Sequenzierungen ist an dieser Stelle ein A, was zum einen nicht ausschließt, dass die Mutation in nicht detektierbarer Häufigkeit eventuell schon im parentalen Virus vorhanden ist und zum anderen eine hohen Selektionsdruck auf die Aminosäuresequenz an dieser Position bestätigt (Tab. 13 und Abb. 39). Nur ein weiterer Nukleotidaustausch im H-Gen wurde bei nt 7276 (A zu G) festgestellt und ist sowohl im parentalen CDV-A75/17red als auch in den hSLAM-adaptierten Viren vorhanden. Hierbei handelt es sich jedoch um eine stille Mutation. Diese hohe Sequenzkonservierung ist ein Grund dafür, dass das CDV-hSLAM weiterhin auch das cSLAM verwendet (Abb. 31).

Es wurde gezeigt, dass die Aminosäuren Y525, D526 und R529 des H-Proteins für die Bindung an das cSLAM von hoher Bedeutung sind (Abb. 39, Zipperle et al. 2010). Diese Aminosäuren beeinflussen jedoch nicht die Oberflächenexpression des H-Proteins und das SLAM-unabhängige F-Triggering (Zipperle et al. 2010). In weiteren Publikationen wurde bestätigt, dass sich adaptionsbedingte Mutationen in den CDV-Oberflächenproteinen überwiegend im rezeptorbindenden Bereich des CDV-H-Proteins befinden. So weist eine Mutationsanalyse von CDV-Isolaten aus B95a-Zellen die Mutationen E530K und T548M auf. Dabei ist die Mutation E530K von größerer Bedeutung für die Adaptierung (Seki et al. 2003). Eine Anpassung aus Makaken-isolierten CDV-Stämmen an hSLAM zeigt unabhängig die Mutationen P541S, D540G und R519S (Sakai et al. 2013). Offenbar können verschiedene Aminosäureaustausche den funktionellen Zugewinn ermöglichen, der letztlich zur Adaptierung führt. Dies wiederum liegt auch begründet in der hohen Heterogenität des H-Proteins (10% zwischen CDV-Stämmen, Messling et al. 2001). Allen gemein ist jedoch der Bereich innerhalb des H-Proteins, in dem diese Mutationen auftauchen.

Ein Vergleich zwischen den H-Proteinen von MV und CDV zeigt einen Unterschied von 64% auf Proteinebene, wobei der rezeptorbindende Bereich jedoch an vielen Aminosäurepositionen identisch ist (Abb. 39; Haas et al. 1997, Haas et al. 1999).

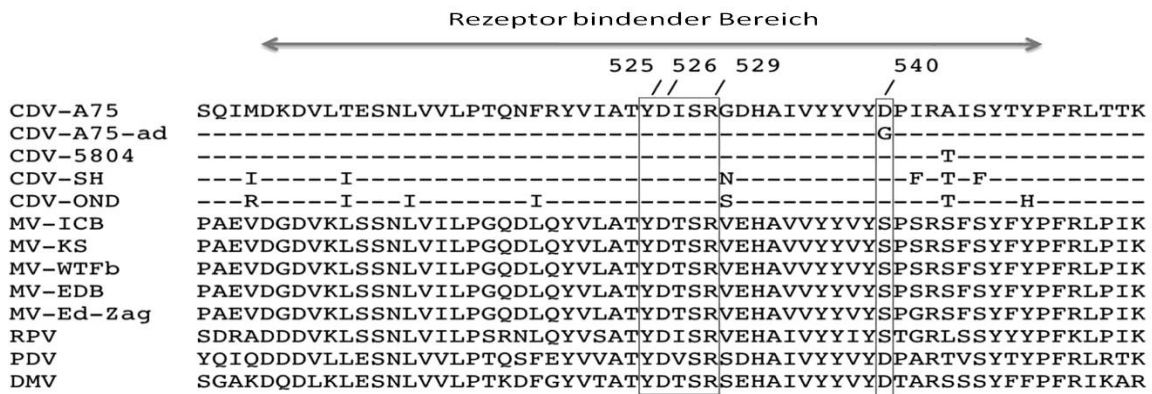


Abbildung 39: Rezeptorbindender Bereich von Morbilliviren (Bieringer et al. 2013)

Die rezeptorbindende Domäne von Morbilliviren befindet sich im H-Protein von Aminosäure 500 bis 550. Die Aminosäuren Y525, D526 und R529 werden von CDV für die Bindung an cSLAM benötigt (Zipperle et al. 2010). Die Adaptierung von CDV-A75/17red an das hSLAM (CDV-A75-ad) weist die Mutation D540G auf. Diese korrespondiert mit der Aminosäure 544 im MV-H-Protein.

Die Notwendigkeit der Mutation D540G im H-Protein des CDV-hSLAM wird durch Transfektionsversuche von Phillippe Plattet und Kollegen belegt (Abb. 40, Bieringer et al. 2013). Die Expression von parentalem CDV-A75/17-H in Kombination mit dem wildtypischem CDV-A75/17-F zeigt nur in den transfizierten Vero-cSLAM-Zellen eine Synzytienbildung, wobei die Expression von CDV-A75/17-H mit der Mutation D540G (CDV-A75/17-H-D540G) in Kombination mit CDV-A75/17-F in beiden Zelllinien Vero-cSLAM und Vero-hSLAM, eine deutliche Synzytienbildung nach 24h verursacht (Abb. 40, Bieringer et al. 2013). Dies beweist, dass die Mutation D540G im H-Protein alleine für die Infektion und Synzytienbildung in Vero-hSLAM-Zellen verantwortlich ist.

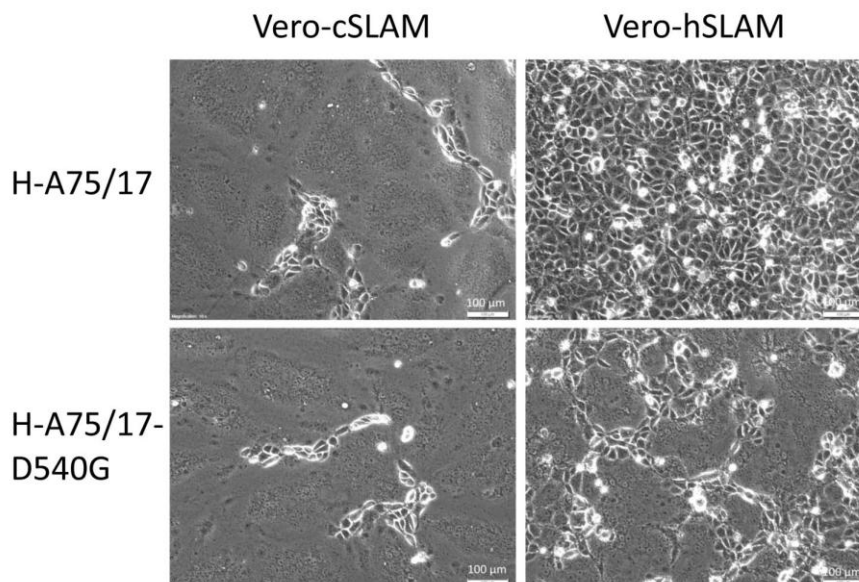


Abbildung 40: Tranfektion von CDV-A75/17-H und CDV-A75/17-F exprimierenden Plasmiden in Vero-cSLAM-Zellen und Vero-hSLAM-Zellen (Bieringer et al. 2013)

Vero-cSLAM-Zellen und Vero-hSLAM-Zellen wurden mit dem wildtypischem CDV-A75/17-F ($F_{A75/17}$) und dem wildtypischem CDV-A75/17-H ($H_{A75/17}$) oder dem CDV-A75/17-H mit der Mutation D540G ($H_{A75/17-D540G}$) transfiziert. Die Hellfeldaufnahmen wurden einen Tag nach Transfektion gemacht (Balken = 100 μ m).

Für die gesamte Genomanalyse wurden zwei unabhängig adaptierte CDV-hSLAM-Viren und sieben Virusklone analysiert. Im N-Protein wurden keine Mutationen gefunden. Aufgrund der Bindung an die virale RNA ist dieses Protein stark konserviert. Im P-Protein konnten weitere Mutationen detektiert werden. Aufgrund der Tatsache, dass Vero-Zellen ein defizientes Interferonsystem haben, kann jedoch eine Anpassung an das nicht adaptive Immunsystem der Zellen ausgeschlossen werden (Emeny und Morgan 1979, Mosca und Pitha 1986, Chew et al. 2009). Diese Mutationen sind auch im parentalen CDV-A75/17red vorhanden. Vermutlich sind die Mutationen durch die stetige Passagierung des parentalen Virus auf Vero-cSLAM-Zellen entstanden. Die Mutationen, deren Entstehung mit der Passagierung auf Vero-Zellen in Verbindung gebracht werden, konnten hier nicht gefunden werden (Plattet et al. 2004). Es muss davon ausgegangen werden, dass es sich um natürliche Polymorphismen handelt die keinem besonderen Selektionsdruck unterliegen und daher spontan entstehen können. Diese These wird im Weiteren von den beschriebenen Mutationen in M- und L- Protein bestärkt, welche ebenfalls nicht bestätigt werden konnten (M: Y26H, V32A, 3515 nt T zu C; L:13772 nt A zu G, 14687 nt T zu C). Weiterhin sind die beschriebenen Mutationen auch in dem CDV-H358 nicht vorhanden, was deren Auftreten, aufgrund natürlicher Varianz, als wahrscheinlichere Erklärung stützt (Tab 11). Wie bereits in 5.1.2 erwähnt sind insgesamt, neben den eingefügten Restriktionsschnittstellen, sieben Mutationen zu finden (Tab. 13 und Abb. 38, Plattet et al. 2004).

5.2.5. Interaktion des Hämagglutinin mit dem humanen SLAM

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Mutation D540G im Hämagglutinin die Bindung von rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red an das hSLAM ermöglicht. Diese Mutation liegt in dem Rezeptorbindenden Bereich des H-Proteins (Abb. 39). Auch die Modellanalyse bestätigt die Interaktion des CDV-A75/17-H-Proteins mit SLAM in diesem Bereich (Abb. 33). Dabei liegt die Aminosäure 540 im direkten Kontakt zur Aminosäure 71 des SLAM (Abb. 33). Ein Vergleich zwischen cSLAM und des hSLAM zeigt an Position 70 und 71 einen Unterschied in der Aminosäurefolge (Abb. 34). Dabei hat die Aminosäure G71 des cSLAM keine Seitenketten wohingegen sich im hSLAM ein Glutaminrest (E) an Position 71 befindet. Weitere Aminosäureunterschiede befinden sich außerhalb des H-bindenden Bereiches und beeinflussen damit die Virusbindung nicht. Durch den Adaptierungsprozess von wildtypischem CDV-A75/17red wird eine Mutation im H-Protein bei Position 540 vom negativ geladenen Asparaginsäurerest (D) zu einem kürzest möglichen ungeladenen Glycin (G) hervorgerufen. Diese Mutation kompensiert den Ladungsunterschied an Position 71 von cSLAM (G) zu hSLAM (E). Damit erfolgt eine Anpassung des CDV-H an die negative Aminosäureladung des humanen Rezeptors bei Position 71 (Abb. 41).

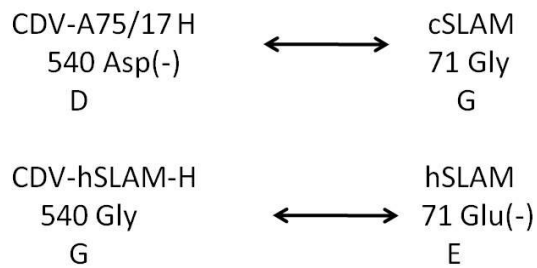


Abbildung 41: Aminosäureveränderung aufgrund der Anpassung von CDV-A75/17red an hSLAM

Das Hämagglutinin des rekombinanten, wildtypischen CDV-A75/17red (CDV-A75/17-H) besitzt an Position 540 einen negativ geladenen Asparaginsäurerest (Asp, D) und interagiert mit der neutralen Aminosäure Glycin (Gly, G) des cSLAM. Das Hämagglutinin des CDV-hSLAM (CDV-hSLAM-H) besitzt an Position 540 ein neutrales Glycin (Gly, G) und behindert dadurch den negativ geladenen Glutaminsäurerest (Glu, E) des hSLAM nicht.

5.3. Vergleich der MV- und CDV-Infektion von humanen B-Lymphozyten Zelllinien

In einem ersten Versuch wurde geprüft, wie gut sich humane mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (hPBMCs) sowie eine humane B-Lymphozyten-Zelllinie mit CDV-A75/17red infizieren lassen (Han J. W. 2010). Hier zeigten sich eine sehr schlechte Infektionsrate und keine messbaren viralen Titer. Der Grund dafür ist vermutlich, dass neben der nicht ganz passenden Rezeptorinteraktion auch das humane angeborene Immunsystem stark gegen die Virusinfektion agiert. Damit kann sich wildtypisches CDV so gut wie nicht auf primären hPBMCs vermehren.

Um eine Aussage treffen zu können, in wie weit das CDV-hSLAM humane Zellen infizieren kann, wurden dessen Vermehrung auf unterschiedlichen humanen B-Lymphozyten (Raji, Raji-DC-SIGN-Zellen) im Zeitraum von fünf Tagen untersucht. Die Verwendung der Raji-DC-SIGN-Zelllinie sollte zeigen, ob die zusätzliche Expression des DC-SIGN, wie bei MV, die Virusinfektion der Zellen verbessert (Witte et al. 2006). Die Analysen zeigen, dass das CDV-hSLAM zu geringen Titern auf diesen Zellen wachsen kann, wobei eine geringfügige Verbesserung des Titers an Tag eins und zwei in Raji-DC-SIGN-Zellen, im Vergleich zu parentalen Raji-Zellen, vorhanden ist. Um zu bestätigen, dass DC-SIGN auch die Aufnahme von CDV fördert, müssten Tests mit dem caninen DC-SIGN und caninen Zelllinien folgen. Interessant an der Form der Titrationskurven war insbesondere, dass der Titer bis zum Tag drei anstieg, dann aber drastisch abfiel. Der Grund dafür könnte die Induktion der Interferonantwort mit Synthese von Typ-I-Interferonen in der Zellkultur sein, was zu der beobachteten effizienten Hemmung der Infektion führen könnte.

Im Vergleich dazu zeigt die Virusvermehrung von MV-IC323eGFP auf den Zelllinien Raji, Raji-DC-SIGN und BJA1 eine deutliche Zunahme des viralen Titers über den Zeitraum von fünf Tagen (Abb. 36). Des Weiteren belegen diese Wachstumskurven, dass der resultierende Titer abhängig von der verwendeten Zelllinie ist. Die Infektion von BJA1 verläuft wesentlich besser als die Infektion von Raji und Raji-DC-SIGN Zellen. Somit haben auch bei MV-Infektionen von humanen B-Lymphozyten die intrinsischen Faktoren der Zellen einen wesentlichen Einfluss auf die virale Infektion

und Replikation (Rima und Duprex 2011). Außerdem zeigt die Abbildung 36, dass Raji-DC-SIGN-Zellen, im Vergleich zu parentalen Raji-Zellen, besser infiziert werden und sich das Virus effizienter repliziert. Dieser natürlicherweise auf Dendritischen Zellen vorkommende Rezeptor DC-SIGN unterschützt dabei die virale Transmission von MV (Witte et al. 2006, Avota et al. 2011).

Zusammenfassend konnte mit diesen Wachstumskurven belegt werden, dass eine Adaptierung von CDV-A75/17red an hSLAM nicht ausreicht, um humane Wirtszellen effizient zu infizieren. Obwohl sich das CDV-A75/17red schnell und effizient an das hSLAM anpasst, ist die virale Replikation in humanen B-Lymphozyten über einen Zeitraum von fünf Tagen restringiert. Folglich spielen intrinsische und durch das angeborene Immunsystem induzierte Faktoren der Zellen eine bedeutende Rolle als Speziesbarriere zwischen CDV und humanen Wirtszellen.

Interessanterweise wurde in den letzten Jahren die natürliche Infektion von Affen mit CDV entdeckt, welche zu zahlreichen Ausbrüchen mit einer signifikanten Morbidität und Mortalität führte (Jones-Engel et al. 2006, Sun et al. 2010, Qiu 2011, Sakai et al. 2013). So konnte eine natürliche Infektion von Makaken mit wildtypischen CDV-Stämmen in Japan und China beobachtet werden (Yoshikawa et al. 1989, Sun et al. 2010, Qiu 2011, Sakai et al. 2012). Dies zeigt, dass wildtypische CDV-Stämme das Makaken-SLAM (mSLAM) per se als Rezeptor verwenden können (Sakai et al. 2012). In vitro Analysen zeigten, dass das aus Makaken isolierte CDV-CYN07-dV das mSLAM und das Makaken Nectin4 genauso effizient verwendet, wie die parentalen Rezeptoren cSLAM und cNectin4 (Sakai et al. 2012). Außerdem beschrieben mehrere Forschergruppen eine Isolierung von wildtypischen CDV-Stämmen mit Hilfe einer B95a B-Lymphozyten-Zelllinie (Kai et al. 1993, Tatsuo et al. 2001, Seki et al. 2003). Auch diese Virusisolate können beide Rezeptoren, mSLAM und cSLAM, verwenden (Seki et al. 2003). Eine direkte CDV-Isolation auf VerohSLAM-Zellen war jedoch in mehreren Projekten nicht möglich (Seki et al. 2003, Sakai et al. 2012, Sakai et al. 2013). Auch das aus Makaken isolierte CDV-CYN07-dV verwendet das hSLAM nur ineffizient (Sakai et al. 2012). Aufgrund der hohen Rezeptoridentität (93%) und der nahen Verwandtschaft von Affen und Menschen, würde man jedoch einen schnellen Wirtswechsel des Virus auf Rezeptorebene erwarten. Dies bestätigt erneut, dass die alleinige Adaptierung von CDV an die Rezeptoren nicht ausreichend ist, und die Speziesbarriere des CDV nicht allein auf der Rezeptorverwendung basiert.

Damit zeigt sich auch, dass eine CDV-Übertragung durch Affen auf den Menschen unwahrscheinlich ist. Da unter anderem für MV auch belegt wurde, dass die Primaten aufgrund der geringen Populationsdichte und der geringen Geburtenzahl kein beständiges Reservoir sind (Jones-Engel et al. 2006). Außerdem diskutieren Studien, dass nach einer Elimination des MV diese Problematik nochmals vermindern würde (Sanders et al. 2011). Diese anhaltende MV-Impfung würde damit auch das Risiko einer CDV-Infektion minimieren, da in Versuchen mit Hunden gezeigt wurde, dass anhand einer MV-Impfung auch ein Schutz vor CDV besteht (Taylor et al. 1991).

6. Anhang

6.1. Amplifikations- und Sequenzierungsprotokoll der Genomsequenzierung

Die Nummerierung der Primerbindung erfolgt nach dem CDV A75/17 Genom (Genbank: AF164967.1). Die Primer wurden zum Einen für die Amplifikation (A) und zum Anderen für die Sequenzierung (S) verwendet.

Leader-Fragment (3-466 bp)

Länge: 464 bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Leaderfw1MB (3-20 bp)	CAGAAAAGTTGGCTATG	A
Nrev2MB (448-466 bp)	CCTCTGGATGCAAATGTAA	A/S

PCR-Programm:

94 °C 4 min; 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 Zyklen; 72 °C 10 min, 10 °C unendlich

Nukleokapsid-Fragment (86 – 1722 bp)

Länge: 1637bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Nfw1MB (86-109 bp)	GTCAGGGTTCAGACCTACCAATAT	A/S
Nrev1MB (1698-1722 bp)	TAGAAGGAGAATTGTTGACTGATGT	A
Nfw2MB (330-350 bp)	AGTATCCTCTCCTTGTTTCGTG	S
Nfw3MB (771-790 bp)	AGAATTGCTGAGGACTTATC	S
Nfw4MB (1192-1208 bp)	TCAGGCTCGGGCAAGAA	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 2 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

Intergenische Region N zu P-Fragment (1565 – 2203 bp)

Länge: 639 bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Nfw5MB (1565-1585 bp)	CCGGAAATCGATGGAAGCA	A/S
Prev2MB (2183-2203 bp)	CGCCTGCAGGTACCACGAGAC	A

PCR-Programm:

95 °C 4min; 95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

Phosphoprotein-Fragment (1743 – 3393 bp)

Länge: 1650 bp, Gelextraktion nach PCR: nein

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Pfw1MB (1743-1761 bp)	GGACCCAGGTCCAACAAAC	A
Prev1MB (3367-3393 bp)	TTTATAATTGCTTTTAAGCGATAGTGA	A
Prev2MB (2183-2203 bp)	CGCCTGCAGGTACCACGAGAC	S
Pfw2MB (2017-2040 bp)	GTCGGCCATGTACTCCAAAATAAT	S
Pfw4MB (2793-2813 bp)	CATACTTTCTAAACTGGATAC	S
Prev3MB (2950-2968 bp)	TGTCGACATTTGCCGTAGG	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 57 °C 1 min, 72 °C 2 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

Intergenische Region P zu M-Fragment (3150 – 3951 bp)

Länge: 801 bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Pfw5MB (3150-3170 bp)	CGGATACAAACCGAAGGATAC	A/S
Mrev2MB (3928-3851 bp)	GAATTCTGTAACCTACCATCGTCTG	A

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

Matrix –Fragment (3408 – 4761bp)

Länge: 1354 bp, Gelextraktion nach PCR: nein

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Mfw1MB (3408-3431 bp)	AGAGCCTAAGTCCTCTCCAAAAAA	A
Mrev1MB (4743-4761 bp)	GGGCAAGTGCGTGGAGGTA	A
Mrev2MB (3928-3951 bp)	GAATTCTGTAACCTACCATCGTCTG	S
Mfw2MB (3720-3743 bp)	TTGGATATTGTGGTAAGGCGAACT	S
Mfw3MB (4256-4279 bp)	GTTCAAGAAAATCCTGTGTTACCC	S
Mfw4MB (4088-4106 bp)	GCATATCGGCAACTTCAGC	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 2 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

Intergenische Region M zu T–Fragment (4256 – 4947 bp)

Länge: 692bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Pfw5MB (3150-3170 bp)	CGGATACAAACCGAAGGATAC	A/S
Mrev2MB (3928-3951 bp)	GAATTCTGTAACCTACCATCGTCTG	A

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 60 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

Fusion –FragmentF1-Fragment (- 5468bp)

Länge: 614 bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
tDtomatofw2MB	ATGGACGAGCTGTACAAGTAA	A/S
Frev5445MB (5421-5444 bp)	TAGTTTTATGACCAAGTACTGGTG	A
Ffw5115MB (5115-5135 bp)	ATGAACAGGATCAGGTCCTGC	S
Frev5115MB (5096-5115 bp)	GATGTAGTGGATGGGCCTG	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 53 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 Zyklen; 72 °C 15 min, 10 °C unendlich

F2-Fragment (5406 – 5967 bp)

Länge: 965 bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Ffw5406 (5406-5427 bp)	ATGACTAGACCCAGTCACCAGT	A
Frev6351MB (6351-6370 bp)	GCACAAGATGAAGTGTCCACC	A/S
Frev5947MB (5947-5967 bp)	CTTGAATTGATATCTCGGCTG	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 Zyklen; 72 °C 15 min, 10 °C unendlich

F3-Fragment (5947 – 7471 bp)

Länge: 1525 bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
F3+ (5947-5967 bp)	CAGCCGAGATATCAATTCAAG	A/S
Hseq1- (8700-8718 bp)	GAATCCCTGTTCGGATTG	A/S
F4+ (6351-6370 bp)	GGTGACACTTCATCTTGTGC	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 56 °C 1 min, 72 °C 2 min 35 Zyklen; 72 °C 10 min, 10 °C unendlich

Hemagglutinin-Fragment (7059 –8990 bp)

Länge: 1932bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primernamen	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Hfw (7059-7087 bp)	AGGGCTCAGGTAGTCCAACAATGCTCTCC	A
Hrev (8965-8990 bp)	TGGAGATGGTTTAATTC AATCGTCCG	A
Hseq1+ (7329-7349 bp)	TACATCACCAAGTCATAGATG	S
Hseq2+ (7729-7749 bp)	CAATATGCTAACCGCTATCTC	S
Hseq3+ (8129-8148 bp)	CGTGGGTTTCATAAAAGATTC	S
Hseq4+ (8527-8547 bp)	CAGGGAATCAAGTGGAAATTG	S
Hseq1- (7453-7471 bp)	GAACTCCCTGTTCCGGATTG	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

Polymerase (L)- Fragment:L1-Fragment (8527 – 11109 bp)

Länge: 2583 bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primernamen	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Hseq4+ (8527-8547 bp)	CAGGGAATCAAGTGGAAATTG	A
Lrev2-1MB (11086-11109 bp)	GGAAAATGAGGGGAGACCGTAGA	A
Lrev1-1MB (9262-9282 bp)	CATGGTTGTGTTTGGGATAAG	S
Lfw1-3MB (9424-9442 bp)	ATCTTAGTATTGGTTTAGG	S
Lfw1-4MB (9963-9983 bp)	ATTCAGGAGATTTTACAGGAC	S
Lfw1-5MB (10375-10392 bp)	AATGCTTTATGCCTCTTA	S
Lfw1-2/1MB (8932-8955 bp)	TTAGGTATGATGACTGTGGTGAGA	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95°C 1 min, 57°C 1 min, 72°C 2min 35 Zyklen; 72°C 7 min, 10°C unendlich

L2-Fragment (10717 – 1276 bp)

Länge: 2060 bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primernamen	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Lfw2MB (10717-10740 bp)	TGATATCTAACGGAATTGGGAAGT	A
Lrev2MB (12754-12776 bp)	ATAGGCCCATGAGTACACAGTTG	A
Lrev2-1MB (11086-11109 bp)	GGAAAATGAGGGGAGACCGTAGA	S
Lfw2-1MB (10927-10946 bp)	ATATAGACCCAAACCCAAAT	S
Lw2-2MB (11319-11339 bp)	TGTTAGAATTGCATCACTTGTC	S
Lfw2-3MB (11768-11785 bp)	ACGGGATGTGATAGAACC	S
Lfw2-4MB (12042-12059 bp)	TGTGTCCAGAGCATAACC	S
Lfw2-5MB (12479-12500)	GGGTCGTCCTATTTATGGTCT	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 59 °C 1 min, 72 °C 2 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

L3-Fragment (12566 – 14583 bp)

Länge: 2018 bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primernamen	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Lfw3MB (12566-12587 bp)	TTGCGCATCAGGCTCTCATAAC	A
Lrev3MB (14561-14583 bp)	GTCTCCCGTTGAAAAGCACAGTC	A
Lrev3-1MB (13016-13054 bp)	CCCAGGCCAGGAGCATAAC	S
Lfw3-1MB (12859-12878 bp)	TTACCCCAATTTCTACTTCT	S
Lfw3-2MB (13280-13302 bp)	CAGGAAGCACATTGTAGAGTTTG	S
Lfw3-3MB (13695-13718 bp)	CTTGACTCCCAGAACCCTACACATA	S
Lfw4MB (14191-14213 bp)	CAAAGATGACCTGGCTAAACTC	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 63 °C 1 min, 72 °C 2 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

L4-Fragment (14191 - 15629 bp)

Länge: 1439 bp, Gelextraktion nach PCR: ja

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
Lfw4MB (14191-14213 bp)	CAAAGATGACCTGGCTAAACTC	A
Lrev4MB (15606-15629 bp)	TTTAATAGCAATGAATAGCAGAGG	A
Lrev3MB (14561-14583 bp)	GTCTCCCGTTGAAAAGCACAGTC	S
Lfw4-1MB (14316-14333 bp)	GCATGTTACAAGGCAGTT	S
Lfw4-2MB (14774-14795 bp)	AATCAAGATCATGCCCGTTAGT	S
Lfw4-3MB (15268-15287 bp)	TGTTCCATGCATACCCAGTG	S

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

6.2. PCR-Kontrolle des Plasmides pF6gW-hN4

1. Fragment (1077 bp)

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
F6GWfw1MB (3956-3979 bp)	CAGTTTCTTTGGTCGGTTTTATGT	A
F6GWrev1MB (5010-5033 bp)	ACAAAGGCATTAAAGCAGCGTATC	A

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 2 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

2. Fragment (635 bp)

Primername	Primersequenz 5` - 3`	Primerfunktion
F6GWfw1MB (3956-3979 bp)	CAGTTTCTTTGGTCGGTTTTATGT	A
hNectin4rev1MB (361-381 bp)	GCACTCGTACTCGCCCTCATC	A

PCR-Programm:

95 °C 4 min; 95 °C 1 min, 55 °C 1 min, 72 °C 1 min 35 Zyklen; 72 °C 7 min, 10 °C unendlich

7. Verzeichnisse

7.1. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Taxonomie der Morbilliviren (NCBI Taxonomy Browser)	1
Abbildung 2: Übersicht eines Morbilliviruspartikels (modifizierte Abbildung nach Vries 2013) .	2
Abbildung 3: Genomstruktur des rekombinanten, wildtypischen CDV-A75/17red	3
Abbildung 4: Aufbau und Struktur des Fusionsprotein (Messling et al. 2004b).....	6
Abbildung 5: Schematische Darstellung des MV-Hämagglutinin und die Modellstrukturen der Faltung (Navaratnarajah et al. 2011).....	7
Abbildung 6: Replikations- und Infektionszyklus von Morbilliviren (modifizierte Abbildung nach Vries 2013).....	9
Abbildung 7: SLAM (CD150; modifizierte Abbildung nach Noyce und Richardson 2012).....	11
Abbildung 8: Interaktion des SLAM mit dem MV-H (Hashiguchi et al. 2011a).....	12
Abbildung 9: Nectin4 (modifizierte Abbildung nach Noyce und Richardson 2012)	13
Abbildung 10: Interaktion des Nectin4 mit dem MV-H (Zhang et al. 2012)	14
Abbildung 11: Infektion der humanen Epithelzelllinie H358 mit CDV-A75/17red (Bieringer et al. 2013)	15
Abbildung 12: Infektion der Vero-hSLAM Zelllinie mit CDV-A75/17red (modifizierte Abbildung nach Han J. W. 2010)	16
Abbildung 13: Virustiter von CDV-A75/17red auf H358-Zellen und Vero-hSLAM-Zellen (modifizierte Abbildung nach Han J. W. 2010)	17
Abbildung 14: Expression von Nectin4 auf H358-Zellen	42
Abbildung 15: Infektion der humanen Epithelzelllinie H358 mit MV-IC323eGFP.....	42
Abbildung 16: Hemmung der CDV-Infektion von H358-Zellen mit humanen Nectin4 Antikörper	43
Abbildung 17: Elektropherogramm der CDV-H358-Sequenz	45
Abbildung 18: Klonierungsmodell des pF6gW-humanen-Nectin4-Plasmids.....	48
Abbildung 19: Expression von humanem Nectin4 auf Vero-hN4-Zellen.....	49
Abbildung 20: Expression von caninem Nectin4 auf Vero-cN4-4T und Vero-cN4-4TS Zelle	51
Abbildung 21: Vergleich der Zellteilungsrate von Vero-, Vero-cN4-4TS- und Vero-hN4-Zellen	51
Abbildung 22: Immunfluoreszenzen von rekombinantem CDV-A75/17red infizierten Vero- cN4-4TS, Vero-hN4 und Vero-Zellen	52
Abbildung 23: Wachstumskurve von CDV-A75/17red auf Nectin4-exprimierenden und parentalen Vero-Zellen.	53
Abbildung 24: Wachstumskurve von MV-IC323eGFP auf Nectin4 exprimierenden und parentalen Vero-Zellen	54
Abbildung 25: Oberflächenexpression von SLAM-exprimierenden Vero-Zelllinien mit dem monoklonalen hSLAM-Antikörper A12	55
Abbildung 26: Oberflächenexpression von SLAM exprimierenden Vero-Zelllinien mit dem monoklonalen hSLAM-Antikörper 5C6	55
Abbildung 27: Infektion der Vero-hSLAM Zellen mit MV-IC323eGFP und Vero-cSLAM Zellen mit CDV-A75/17red.....	56
Abbildung 28: Infektion der Vero-hSLAM Zellen mit CDV A75/17red.....	57
Abbildung 29: Virustiter des an humanes SLAM-adaptierten CDV-A75/17red (modifizierte Abbildung nach Bieringer et al. 2013)	58
Abbildung 30: Immunfluoreszenzen von rekombinantem, wildtypischem CDV-A75/17red und CDV-hSLAM infizierten Vero-cSLAM- und Vero-hSLAM-Zellen	59

Abbildung 31: Wachstumskurven von CDV-A75/17red und CDV-hSLAM auf SLAM-exprimierenden Vero-Zellen (modifizierte Abbildung nach Bieringer et al. 2013).	60
Abbildung 32: Hemmung der CDV-A75/17red-Infektion von SLAM-exprimierenden Zellen mit hSLAM-Antikörper (Bieringer et al. 2013).	61
Abbildung 33: Strukturmodell der CDV-H-hCD150 Interaktion (Bieringer et al. 2013)	64
Abbildung 34: Vergleich der caninen und humanen CD150-Sequenz in dem Morbillivirus H-bindenden Bereich (Bieringer et al. 2013).	64
Abbildung 35: Wachstumskurven von CDV-A75/17red auf B-Lymphozyten Zelllinien.....	66
Abbildung 36: Wachstumskurven von MV-IC323eGFP auf B-Lymphozyten Zelllinien	66
Abbildung 37: Wachstumskurven von CDV-hSLAM auf B-Lymphozyten Zelllinien	67
Abbildung 38 : Klonierungsstrategie des rekombinanten CDV-A75/17 (Plattet et al. 2004)...	71
Abbildung 39: Rezeptorbindender Bereich von Morbilliviren (Bieringer et al. 2013).	76
Abbildung 40: Tranfektion von CDV-A75/17-H und CDV-A75/17-F exprimierenden Plasmiden in Vero-cSLAM-Zellen und Vero-hSLAM-Zellen (Bieringer et al. 2013)	76
Abbildung 41: Aminosäureveränderung aufgrund der Anpassung von CDV-A75/17red an hSLAM.....	78

7.2. Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Pipettierschema für die Reverse Transkription.....	32
Tabelle 2: PCR-Ansatz mit PuRe-Taq Ready-To-Go-PCR-Beads	32
Tabelle 3: PCR-Ansatz mit <i>Taq-DNA-Polymerase</i>	33
Tabelle 4: PCR-Ansatz mit <i>Phusion-Green-Hot-StartII-High-Fidelity-DNA-Polymerase</i>	33
Tabelle 5: Ansatz für den enzymatischen Verdau	34
Tabelle 6: Pipettierschema für <i>Klenow-Fragment</i> Behandlung	34
Tabelle 7: Pipettierschema für die DNA-Phosphorylierung	34
Tabelle 8: T4-DNA-Ligationsansatz	35
Tabelle 9: Sequenzierungsprotokoll.....	36
Tabelle 10: Sequenzierungsprogramm mit 25 Zyklen.....	36
Tabelle 11: Übersicht über die Mutationen im CDV-H358.....	46
Tabelle 12: Analyse der Transduktionseffizienz von Vero-cN4-Zellen mittels Durchflusszytometrie	50
Tabelle 13: Übersicht über die Mutationen im hSLAM-adaptierten CDV-A75/17red	63

7.3. Literaturverzeichnis

- A** **Anderson**, D.E; Messling, V. von (2008): Region between the canine distemper virus M and F genes modulates virulence by controlling fusion protein expression. In: *J. Virol.* 82 (21), S. 10510–10518.
- Appel**, M. J.; Summers, B. A. (1995): Pathogenicity of morbilliviruses for terrestrial carnivores. In: *Vet Microbiol* 44 (2-4), S. 187–191.
- Appel**, M. J.; Yates, R. A.; Foley, G. L.; Bernstein, J. J.; Santinelli, S.; Spelman, L. H. et al. (1994): Canine distemper epizootic in lions, tigers, and leopards in North America. In: *J Vet Diagn Invest* 6 (3), S. 277–288.
- Aversa**, G.; Chang, C. C.; Carballido, J. M.; Cocks, B. G.; Vries, J. E. de (1997): Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. In: *J Immunol* 158 (9), S. 4036–4044.
- Avota**, E.; Gulbins, E.; Schneider-Schaulies, S. (2011): DC-SIGN Mediated Sphingomyelinase-Activation and Ceramide Generation Is Essential for Enhancement of Viral Uptake in Dendritic Cells. In: *PLoS Pathog.* 7 (2), S. e1001290.
- B** **Baker**, K. A.; Dutch, R. E.; Lamb, R. A.; Jardetzky, T. S. (1999): Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. In: *Mol Cell* 3 (3), S. 309–319.
- Beineke**, A.; Puff, C.; Seehusen, F.; Baumgärtner, W. (2009): Pathogenesis and immunopathology of systemic and nervous canine distemper. In: *Veterinary Immunology and Immunopathology* 127 (1-2), S. 1–18.
- Bellini**, W. J.; Englund, G.; Richardson, C. D.; Rozenblatt, S.; Lazzarini, R. A. (1986): Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences, and deduced amino acid sequences. In: *J. Virol.* 58 (2), S. 408–416.
- Bellini**, W. J.; Rota, P. A. (2011): Biological feasibility of measles eradication. In: *Virus Res.* 162 (1-2), S. 72–79.
- Bieringer**, M.; Han, J. W.; Kendl, S.; Khosravi, M.; Plattet, P.; Schneider-Schaulies, J. (2013): Experimental adaptation of wild-type canine distemper virus (CDV) to the human entry receptor CD150. In: *PLoS ONE* 8 (3), S. e57488.
- Brancati**, F.; Fortugno, P.; Bottillo, I.; Lopez, M.; Josselin, E.; Boudghene-Stambouli, O. et al. (2010): Mutations in PVRL4, encoding cell adhesion molecule nectin-4, cause ectodermal dysplasia-syndactyly syndrome. In: *Am. J. Hum. Genet.* 87 (2), S. 265–273.
- C** **Campadelli-Fiume**, G.; Cocchi, F.; Menotti, L.; Lopez, M. (2000): The novel receptors that mediate the entry of herpes simplex viruses and animal alphaherpesviruses into cells. In: *Rev. Med. Virol.* 10 (5), S. 305–319.
- Cathomen**, T.; Mrkic, B.; Spehner, D.; Drillien, R.; Naef, R.; Pavlovic, J. et al. (1998): A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. In: *EMBO J.* 17 (14), S. 3899–3908.

- Chang, A.;** Dutch, R. E. (2012): Paramyxovirus Fusion and Entry: Multiple Paths to a Common End. In: *Viruses* 4 (12), S. 613–636.
- Chew, T.;** Noyce, R.; Collins, S. E.; Hancock, M. H.; Mossman, K. L. (2009): Characterization of the interferon regulatory factor 3-mediated antiviral response in a cell line deficient for IFN production. In: *Molecular Immunology* 46 (3), S. 393–399.
- Chinnakannan, S. K.;** Nanda, S. K.; Baron, M. D. (2013): Morbillivirus v proteins exhibit multiple mechanisms to block type 1 and type 2 interferon signalling pathways. In: *PLoS ONE* 8 (2), S. e57063.
- Chomczynski, P.;** Sacchi, N. (1987): Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. In: *Anal. Biochem.* 162 (1), S. 156–159.
- Cocchi, F.;** Lopez, M.; Dubreuil, P.; Campadelli Fiume, G.; Menotti, L. (2001): Chimeric nectin1-poliovirus receptor molecules identify a nectin1 region functional in herpes simplex virus entry. In: *J. Virol.* 75 (17), S. 7987–7994.
- Confer, A. W.;** Kahn, D. E.; Koestner, A.; Krakowka, S. (1975): Biological properties of a canine distemper virus isolate associated with demyelinating encephalomyelitis. In: *Infect. Immun.* 11 (4), S. 835–844.
- Cook, S. D.;** Dowling, P. C.; Russell, W. C. (1979): Neutralizing antibodies to canine distemper and measles virus in multiple sclerosis. In: *J. Neurol. Sci.* 41 (1), S. 61–70.
- D Derycke, M. S.;** Pambuccian, S. E.; Gilks, C. B.; Kalloger, S. E.; Ghidouche, A.; Lopez, M. et al. (2010): Nectin 4 overexpression in ovarian cancer tissues and serum: potential role as a serum biomarker. In: *Am. J. Clin. Pathol.* 134 (5), S. 835–845.
- Devaux, P.;** Cattaneo, R. (2004): Measles virus phosphoprotein gene products: conformational flexibility of the P/V protein amino-terminal domain and C protein infectivity factor function. In: *J. Virol.* 78 (21), S. 11632–11640.
- Devaux, P.;** Priniski, L.; Cattaneo, R. (2013): The measles virus phosphoprotein interacts with the linker domain of STAT1. In: *Virology* 444 (1-2), S. 250–256.
- Dong, J.-b.;** Saito, A.; Mine, Y.; Sakuraba, Y.; Nibe, K.; Goto, Y. et al. (2009): Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness. In: *Virus Genes* 39 (3), S. 330–334.
- Dull, T.;** Zufferey, R.; Kelly, M.; Mandel, R. J.; Nguyen, M.; Trono, D.; Naldini, L. (1998): A third-generation lentivirus vector with a conditional packaging system. In: *J. Virol.* 72 (11), S. 8463–8471.
- E Emeny, J. M.;** Morgan, M. J. (1979): Regulation of the interferon system: evidence that Vero cells have a genetic defect in interferon production. In: *J. Gen. Virol.* 43 (1), S. 247–252.
- ENDERS, J. F.;** PEEBLES, T. C. (1954): Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. In: *Proc Soc Exp Biol Med* 86 (2), S. 277–286.

- Erlenhoefer**, C.; Wurzer, W. J.; Löffler, S.; Schneider-Schaulies, S.; ter Meulen, V.; Schneider-Schaulies, J. (2001): CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. In: *J. Virol.* 75 (10), S. 4499–4505.
- Frenzke**, M.; Sawatsky, B.; Wong, X. X.; Delpeut, S.; Mateo, M.; Cattaneo, R.; Messling, V. von (2013): Nectin-4-Dependent Measles Virus Spread to the Cynomolgus Monkey Tracheal Epithelium: Role of Infected Immune Cells Infiltrating the Lamina Propria. In: *J. Virol.* 87 (5), S. 2526–2534.
- F** **Frisk**, A. L.; König, M.; Moritz, A.; Baumgartner, W. (1999): Detection of canine distemper virus nucleoprotein RNA by reverse transcription-PCR using serum, whole blood, and cerebrospinal fluid from dogs with distemper. In: *J Clin Microbiol* 37 (11), S. 3634–3643.
- G** **Geeraedts**, F.; Wilczak, N.; van Binnendijk, R.; Keyser, J. de (2004): Search for morbillivirus proteins in multiple sclerosis brain tissue. In: *Neuroreport* 15 (1), S. 27–32.
- Geraghty**, R. J.; Krummenacher, C.; Cohen, G. H.; Eisenberg, R. J.; Spear, P. G. (1998): Entry of alphaherpesviruses mediated by poliovirus receptor-related protein 1 and poliovirus receptor. In: *Science* 280 (5369), S. 1618–1620.
- H** **Haas**, L.; Liermann, H.; Harder, T. C.; Barrett, T.; Lochelt, M.; Messling, V. von et al. (1999): Analysis of the H gene, the central untranslated region and the proximal coding part of the F gene of wild-type and vaccine canine distemper viruses. In: *Vet Microbiol* 69 (1-2), S. 15–18.
- Haas**, L.; Martens, W.; Greiser-Wilke, I.; Mamaev, L.; Butina, T.; Maack, D.; Barrett, T. (1997): Analysis of the haemagglutinin gene of current wild-type canine distemper virus isolates from Germany. In: *Virus Res.* 48 (2), S. 165–171.
- Haile**, R.; Smith, P.; Read, D.; Nassim, D.; Warlow, C.; Russell, W. C. (1982): A study of measles virus and canine distemper virus antibodies, and of childhood infections in multiple sclerosis patients and controls. In: *J. Neurol. Sci.* 56 (1), S. 1–10.
- Han** J. W. (2010): Adaptierung eines Hundestaupervirus an humane Zielzellen. In: *Diplomarbeit am Institut für Virologie, Universität Würzburg.*
- Hanahan**, D. (1983): Studies on transformation of *Escherichia coli* with plasmids. In: *J Mol Biol* 166 (4), S. 557–580.
- Hara**, Y.; Suzuki, J.; Noguchi, K.; Terada, Y.; Shimoda, H.; Mizuno, T.; Maeda, K. (2013): Function of Feline Signaling Lymphocyte Activation Molecule as a Receptor of Canine Distemper Virus. In: *J Vet Med Sci* 75 (8), S. 1085–1089.
- Hashiguchi**, T.; Kajikawa, M.; Maita, N.; Takeda, M.; Kuroki, K.; Sasaki, K. et al. (2007): Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A* 104 (49), S. 19535–19540.
- Hashiguchi**, T.; Ose, T.; Kubota, M.; Maita, N.; Kamishikiryo, J.; Maenaka, K.; Yanagi, Y. (2011a): Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2), S. 135–141.

- Hashiguchi**, T.; Ose, T.; Kubota, M.; Maita, N.; Kamishikiryo, J.; Maenaka, K.; Yanagi, Y. (2011b): Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2), S. 135–141.
- Hashimoto**, K.; Ono, N.; Tatsuo, H.; Minagawa, H.; Takeda, M.; Takeuchi, K.; Yanagi, Y. (2002): SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein. In: *J. Virol.* 76 (13), S. 6743–6749.
- Henning**, G.; Kraft, M. S.; Derfuss, T.; Pirzer, R.; Saint-Basile, G. de; Aversa, G. et al. (2001): Signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) regulates T cellular cytotoxicity. In: *Eur. J. Immunol.* 31 (9), S. 2741–2750.
- Horikami**, S. M.; Smallwood, S.; Bankamp, B.; Moyer, S. A. (1994): An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. In: *Virology* 205 (2), S. 540–545.
- I Ikegame**, S.; Takeda, M.; Ohno, S.; Nakatsu, Y.; Nakanishi, Y.; Yanagi, Y. (2010): Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells. In: *J. Virol.* 84 (1), S. 372–379.
- J Jones-Engel**, L.; Engel, G. A.; Schillaci, M. A.; Lee, Benjamin; H., J.; Chalise, M.; Kyes, R. C. (2006): Considering human-primate transmission of measles virus through the prism of risk analysis. In: *Am. J. Primatol.* 68 (9), S. 868–879.
- K Kai**, C.; Ochikubo, F.; Okita, M.; Inuma, T.; Mikami, T.; Kobune, F.; Yamanouchi, K. (1993): Use of B95a cells for isolation of canine distemper virus from clinical cases. In: *J Vet Med Sci* 55 (6), S. 1067–1070.
- Kapil**, S.; Allison, R. W.; Johnston, L.; Murray, B. L.; Holland, S.; Meinkoth, J.; Johnson, B. (2008): Canine Distemper Virus Strains Circulating among North American Dogs. In: *Clinical and Vaccine Immunology* 15 (4), S. 707–712.
- Kelley**, L. A.; Sternberg, M. J. E. (2009): Protein structure prediction on the Web: a case study using the Phyre server. In: *Nat Protoc* 4 (3), S. 363–371.
- Kiel**, Mark J.; Yilmaz, Omer H.; Iwashita, Toshihide; Yilmaz, Osman H.; Terhorst, Cox; Morrison, Sean J. (2005): SLAM family receptors distinguish hematopoietic stem and progenitor cells and reveal endothelial niches for stem cells. In: *Cell* 121 (7), S. 1109–1121.
- L La Carré**, H. (1905): Sur la maladie des jeunes chiens In: *Comptes rendus de l'académie des sciences [III]* (140), S. 689-90 und 1489-91.
- Laidlaw**, P.P.; Dunkin, G.W (1926): Studies in dog-distemper. In: *Journal of Comparative Pathology and Therapeutics* 39, S. 222–230.
- Lamb**, R. A.; Jardetzky, T. S. (2007): Structural basis of viral invasion: lessons from paramyxovirus F. In: *Curr. Opin. Struct. Biol.* 17 (4), S. 427–436.
- Langedijk**, J. P.; Daus, F. J.; van Oirschot, J. T. (1997): Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin. In: *J. Virol.* 71 (8), S. 6155–6167.

- Leonard**, V. H. J.; Sinn, P. L.; Hodge, G.; Miest, T.; Devaux, P.; Oezguen, N. et al. (2008): Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. In: *J. Clin. Invest.* 118 (7), S. 2448–2458.
- Liljeroos**, L.; Huiskonen, J. T.; Ora, A.; Susi, P.; Butcher, S. J. (2011): Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 (44), S. 18085–18090.
- Ludlow**, M.; Allen, I.; Schneider-Schaulies, J. (2009): Systemic spread of measles virus: overcoming the epithelial and endothelial barriers. In: *Thromb. Haemost.* 102 (6), S. 1050–1056.
- Ludlow**, M.; Lemon, K.; Vries, R. D. de; McQuaid, S.; Millar, E. L.; van Amerongen, G. et al. (2013): Measles Virus Infection of Epithelial Cells in the Macaque Upper Respiratory Tract Is Mediated by Subepithelial Immune Cells. In: *J. Virol.* 87 (7), S. 4033–4042.
- M Martella**, V.; Cirone, F.; Elia, G.; Lorusso, E.; Decaro, N.; Campolo, M. et al. (2006): Heterogeneity within the hemagglutinin genes of canine distemper virus (CDV) strains detected in Italy. In: *Vet Microbiol* 116 (4), S. 301–309.
- Martella**, V.; Elia, G.; Lucente, M. S.; Decaro, N.; Lorusso, E.; Banyai, K. et al. (2007): Genotyping canine distemper virus (CDV) by a hemi-nested multiplex PCR provides a rapid approach for investigation of CDV outbreaks. In: *Vet Microbiol* 122 (1-2), S. 32–42.
- Masuda**, M.; Sato, H.; Kamata, H.; Katsuo, T.; Takenaka, A.; Miura, R. et al. (2006): Characterization of monoclonal antibodies directed against the canine distemper virus nucleocapsid protein. In: *Comp. Immunol. Microbiol. Infect. Dis.* 29 (2-3), S. 157–165.
- Mateo**, M.; Navaratnarajah, C. K.; Syed, S.; Cattaneo, R. (2013): The measles virus hemagglutinin β -propeller head β 4- β 5 hydrophobic groove governs functional interactions with nectin-4 and CD46 but not with the signaling lymphocytic activation molecule. In: *J. Virol.* 87 (16), S. 9208–9216.
- McCarthy**, A. J.; Shaw, M. A.; Goodman, S. J. (2007): Pathogen evolution and disease emergence in carnivores. In: *Proc. Biol. Sci.* 274 (1629), S. 3165–3174.
- Messling**, V. von; Milosevic, D.; Cattaneo, R. (2004a): Tropism illuminated: lymphocyte-based pathways blazed by lethal morbillivirus through the host immune system. In: *Proc Natl Acad Sci U S A* 101 (39), S. 14216–14221.
- Messling**, V. von; Milosevic, D.; Devaux, P.; Cattaneo, R. (2004b): Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. In: *J. Virol.* 78 (15), S. 7894–7903.
- Messling**, V. von; Oezguen, N.; Zheng, Q.; Vongpunsawad, S.; Braun, W.; Cattaneo, R. (2005): Nearby clusters of hemagglutinin residues sustain SLAM-dependent canine distemper virus entry in peripheral blood mononuclear cells. In: *J. Virol.* 79 (9), S. 5857–5862.
- Messling**, V. von; Zimmer, G.; Herrler, G.; Haas, L.; Cattaneo, R. (2001): The hemagglutinin of canine distemper virus determines tropism and cytopathogenicity. In: *J. Virol.* 75 (14), S. 6418–6427.

- Messling**, V. von; Svitek, N.; Cattaneo, R. (2006): Receptor (SLAM CD150) recognition and the V protein sustain swift lymphocyte-based invasion of mucosal tissue and lymphatic organs by a morbillivirus. In: *J. Virol.* 80 (12), S. 6084–6092.
- Miyajima**, N.; Takeda, M.; Tashiro, M.; Hashimoto, K.; Yanagi, Y.; Nagata, K.; Takeuchi, K. (2004): Cell tropism of wild-type measles virus is affected by amino acid substitutions in the P, V and M proteins, or by a truncation in the C protein. In: *J. Gen. Virol.* 85 (10), S. 3001–3006.
- Mosca**, J. D.; Pitha, P. M. (1986): Transcriptional and posttranscriptional regulation of exogenous human beta interferon gene in simian cells defective in interferon synthesis. In: *Mol. Cell. Biol.* 6 (6), S. 2279–2283.
- Moss**, W. J.; Griffin, D. E. (2012): Measles. In: *Lancet* 379 (9811), S. 153–164.
- Mühlebach**, M. D.; Mateo, M.; Sinn, P. L.; Prüfer, S.; Uhlig, K. M.; Leonard, V. H. J. et al. (2011): Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. In: *Nature* 480 (7378), S. 530–533.
- N Nakatsu**, Y.; Takeda, M.; Ohno, S.; Shirogane, Y.; Iwasaki, M.; Yanagi, Y. (2008): Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. In: *J. Virol.* 82 (17), S. 8296–8306.
- Navaratnarajah**, C. K.; Oezguen, N.; Rupp, L.; Kay, L.; Leonard, V. H.; Braun, W.; Cattaneo, R. (2011): The heads of the measles virus attachment protein move to transmit the fusion-triggering signal. In: *Nat. Struct. Mol. Biol.* 18 (2), S. 128–134.
- NCBI Taxonomy Browser**:
http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Undef&id=11159&lvl=3&p=mapview&p=has_linkout&p=blast_url&p=genome_blast&keep=1&srchmode=1&unlock, zuletzt geprüft am 10.02.2014.
- Noyce**, R. S.; Bondre, D. G.; Ha, M. N.; Lin, L. T.; Sisson, G.; Tsao, M. S.; Richardson, C. D. (2011): Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. In: *PLoS Pathog.* 7 (8), S. e1002240.
- Noyce**, R. S.; Delpeut, S.; Richardson, C. D. (2013): Dog nectin-4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus that facilitates virus entry and syncytia formation. In: *Virology* 436 (1), S. 210–220.
- Noyce**, R. S.; Richardson, C. D. (2012): Nectin 4 is the epithelial cell receptor for measles virus. In: *Trends in microbiology* 20 (9), S. 429–439.
- O Ogita**, H.; Rikitake, Y.; Miyoshi, J.; Takai, Y. (2010): Cell adhesion molecules nectins and associating proteins: Implications for physiology and pathology. In: *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci* 86 (6), S. 621–629.
- Ogita**, H.; Takai, Y. (2006): Nectins and nectin-like molecules: roles in cell adhesion, polarization, movement, and proliferation. In: *IUBMB Life* 58 (5-6), S. 334–343.
- Ohno**, S.; Seki, F.; Ono, N.; Yanagi, Y. (2003): Histidine at position 61 and its adjacent amino acid residues are critical for the ability of SLAM (CD150) to act as a cellular receptor for measles virus. In: *J. Gen. Virol.* 84 (Pt 9), S. 2381–2388.

- Ono, N.;** Tatsuo, H.; Hidaka, Y.; Aoki, T.; Minagawa, H.; Yanagi, Y. (2001a): Measles viruses on throat swabs from measles patients use signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) but not CD46 as a cellular receptor. In: *J. Virol.* 75 (9), S. 4399–4401.
- Ono, N.;** Tatsuo, H.; Tanaka, K.; Minagawa, H.; Yanagi, Y. (2001b): V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor. In: *J. Virol.* 75 (4), S. 1594–1600.
- Ostrakhovitch, E. A.;** Li, S. S-C (2006): The role of SLAM family receptors in immune cell signaling. In: *Biochem. Cell Biol.* 84 (6), S. 832–843.
- Otsuki, N.;** Nakatsu, Y.; Kubot, T.; Sekizuka, T.; Seki, F.; Sakai, K. et al. (2013a): The V Protein of Canine Distemper Virus Is Required for Virus Replication in Human Epithelial Cells. In: *PLoS ONE* 8 (12), S. e82343.
- Otsuki, N.;** Sekizuka, T.; Seki, F.; Sakai, K.; Kubota, T.; Nakatsu, Y. et al. (2013b): Canine distemper virus with the intact C protein has the potential to replicate in human epithelial cells by using human nectin4 as a receptor. In: *Virology* 435 (2), S. 485–492.
- P Pavlova, N. N.;** Pallasch, C.; Elia, A. E.; Braun, C. J.; Westbrook, T. F.; Hemann, M.; Elledge, S. J. (2013): A role for PVRL4-driven cell-cell interactions in tumorigenesis. In: *Elife* 2, S. e00358.
- Plattet, P. M.;** Zweifel, C.; Wiederkehr, C.; Belloy, L.; Cherpillod, P.; Zurbriggen, A.; Wittek, R. (2004): Recovery of a persistent Canine distemper virus expressing the enhanced green fluorescent protein from cloned cDNA. In: *Virus Res.* 101 (2), S. 147–153.
- Plempner, R. K.;** Hammond, A. L.; Cattaneo, R. (2000): Characterization of a region of the measles virus hemagglutinin sufficient for its dimerization. In: *J. Virol.* 74 (14), S. 6485–6493.
- Plempner, Richard K.;** Brindley, Melinda A.; Iorio, Ronald M. (2011): Structural and mechanistic studies of measles virus illuminate paramyxovirus entry. In: *PLoS Pathog.* 7 (6), S. e1002058.
- Plumet, S.;** Duprex, W. P.; Gerlier, D. (2005): Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. In: *J. Virol.* 79 (11), S. 6900–6908.
- Pratakpiriya, W.;** Seki, F.; Otsuki, N.; Sakai, K.; Fukuhara, H.; Katamoto, H. et al. (2012): Nectin4 is an epithelial cell receptor for canine distemper virus and involved in the neurovirulence. In: *J. Virol.* 86 (18), S. 10207–10210.
- Punnonen, J.;** Cocks, B. G.; Carballido, J. M.; Bennett, B.; Peterson, D.; Aversa, G.; Vries, J. E. de (1997): Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes. In: *J Exp Med* 185 (6), S. 993–1004.
- Q Qiu, W.** (2011): Canine Distemper Outbreak in Rhesus Monkeys, China. In: *Emerg. Infect. Dis.* 17 (8), S. 1541–2543.

- R Racaniello, V.** (2011): Virology. An exit strategy for measles virus. In: *Science* 334 (6063), S. 1650–1651.
- Reuter, T.; Weissbrich, B.; Schneider-Schaulies, S.; Schneider-Schaulies, J.** (2006): RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. In: *J. Virol.* 80 (12), S. 5951–5957.
- Reymond, N.; Fabre, S.; Lecocq, E.; Adelaïde, J.; Dubreuil, P.; Lopez, M.** (2001): Nectin4/PRR4, a new afadin-associated member of the nectin family that trans-interacts with nectin1/PRR1 through V domain interaction. In: *J. Biol. Chem.* 276 (46), S. 43205–43215.
- Riedl, P.; Moll, M.; Klenk, H. D.; Maisner, A.** (2002): Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. In: *Virus Res.* 83 (1-2), S. 1–12.
- Rima, B. K.; Duprex, W. P.** (2011): New concepts in measles virus replication: getting in and out in vivo and modulating the host cell environment. In: *Virus Res.* 162 (1-2), S. 47–62.
- Roelke-Parker, M. E.; Munson, L.; Packer, C.; Kock, R.; Cleaveland, S.; Carpenter, M. et al.** (1996): A canine distemper virus epidemic in Serengeti lions (*Panthera leo*). In: *Nature* 379 (6564), S. 441–445.
- Rohowsky-Kochan, C.; Dowling, P. C.; Cook, S. D.** (1995): Canine distemper virus-specific antibodies in multiple sclerosis. In: *Neurology* 45 (8), S. 1554–1560.
- Röthlisberger, A.; Wiener, D.; Schweizer, M.; Peterhans, E.; Zurbriggen, A.; Plattet, P.** (2010): Two domains of the V protein of virulent canine distemper virus selectively inhibit STAT1 and STAT2 nuclear import. In: *J. Virol.* 84 (13), S. 6328–6343.
- Runkler, N.; Pohl, C.; Schneider-Schaulies, S.; Klenk, H. D.; Maisner, A.** (2007): Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. In: *Cell. Microbiol.* 9 (5), S. 1203–1214.
- S Sakai, K.; Nagata, N.; Ami, Y.; Seki, F.; Suzaki, Y.; Iwata-Yoshikawa, N. et al.** (2012): Lethal Canine Distemper Virus Outbreak in Cynomolgus Monkeys in Japan in 2008. In: *J. Virol.* 87 (2), S. 1105–1114.
- Sakai, K.; Yoshikawa, T.; Seki, F.; Fukushi, S.; Tahara, M.; Nagata, N. et al.** (2013): Canine Distemper Virus Associated with a Lethal Outbreak in Monkeys Can Readily Adapt To Use Human Receptors. In: *J. Virol.* 87 (12), S. 7170–7175.
- Sanders, R.; Dabbagh, A.; Featherstone, D.** (2011): Risk Analysis for Measles Reintroduction After Global Certification of Eradication. In: *Journal of Infectious Diseases* 204 (Supplement 1), S. S71.
- Sanger, F.; Nicklen, S.; Coulson, A. R.** (1977): DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. In: *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 74 (12), S. 5463–5467.
- Santibanez, S.; Niewiesk, S.; Heider, A.; Schneider-Schaulies, J.; Berbers, G. A. M.; Zimmermann, A. et al.** (2005): Probing neutralizing-antibody responses against

emerging measles viruses (MVs): immune selection of MV by H protein-specific antibodies? In: *J. Gen. Virol.* 86 (Pt 2), S. 365–374.

Santibanez, S.; Tischer, A.; Heider, A.; Siedler, A.; Hengel, H. (2002): Rapid replacement of endemic measles virus genotypes. In: *J. Gen. Virol.* 83 (Pt 11), S. 2699–2708.

Sawatsky, B.; Messling, V. von (2010): Canine distemper viruses expressing a hemagglutinin without N-glycans lose virulence but retain immunosuppression. In: *J. Virol.* 84 (6), S. 2753–2761.

Sawatsky, B.; Wong, X. X.; Hinkelmann, S.; Cattaneo, R.; Messling, V. von (2012): Canine distemper virus epithelial cell infection is required for clinical disease but not for immunosuppression. In: *J. Virol.* 86 (7), S. 3658–3666.

Schwartzberg, P. L.; Mueller, K. L.; Qi, H.; Cannons, J. L. (2009): SLAM receptors and SAP influence lymphocyte interactions, development and function. In: *Nat Rev Immunol* 9 (1), S. 39–46.

Seki, F.; Ono, N.; Yamaguchi, R.; Yanagi, Y. (2003): Efficient isolation of wild strains of canine distemper virus in Vero cells expressing canine SLAM (CD150) and their adaptability to marmoset B95a cells. In: *J. Virol.* 77 (18), S. 9943–9950.

Sencer, D. J.; Dull, H. B.; Langmuir, A. D. (1967): Epidemiologic basis for eradication of measles in 1967. In: *Public Health Rep* 82 (3), S. 253–256.

Sinn, P.L.; Williams, G.; Vongpunsawad, S.; Cattaneo, R.; McCray, P. B. [JR] (2002): Measles virus preferentially transduces the basolateral surface of well-differentiated human airway epithelia. In: *J. Virol.* 76 (5), S. 2403–2409.

Sips, G. J.; Chesik, D.; Glazenburg, L.; Wilschut, J.; Keyser, J. de; Wilczak, N. (2007): Involvement of morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease. In: *Rev. Med. Virol.* 17 (4), S. 223–244.

Stettler, M.; Zurbriggen, A. (1995): Nucleotide and deduced amino acid sequences of the nucleocapsid protein of the virulent A75/17-CDV strain of canine distemper virus. In: *Vet Microbiol* 44 (2-4), S. 211–217.

Sudfeld, C. R.; Navar, A. M.; Halsey, N. A. (2010): Effectiveness of measles vaccination and vitamin A treatment. In: *International Journal of Epidemiology* 39 (Supplement 1), S. i48.

Sugai, A.; Kooriyama, T.; Sato, H.; Yoneda, M.; Kai, C. (2009): Epitope mapping of canine distemper virus phosphoprotein by monoclonal antibodies. In: *Microbiol. Immunol.* 53 (12), S. 667–674.

Sultan, S.; Lan, N. T.; Ueda, T.; Yamaguchi, R.; Maeda, K.; Kai, K. (2009): Propagation of Asian isolates of canine distemper virus (CDV) in hamster cell lines. In: *Acta. Vet. Scand.* 51, S. 38.

Summers, B. A.; Greisen, H. A.; Appel, M. J. (1979): Early events in canine distemper demyelinating encephalomyelitis. In: *Acta. Neuropathol.* 46 (1-2), S. 1–10.

- Sun, Z.;** Li, A.; Y., H.; Shi, Y.; Hu, Z.; Zeng, L. (2010): Natural infection with canine distemper virus in hand-feeding Rhesus monkeys in China. In: *Veterinary Microbiology* 141 (3-4), S. 374–378.
- Suryanarayana, K.;** Baczko, K.; ter Meulen, V.; Wagner, R. R. (1994): Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. In: *J. Virol.* 68 (3), S. 1532–1543.
- Swart, R. L. de** (2009): Measles studies in the macaque model. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* (330), S. 55–72. Online verfügbar unter <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=19203104>.
- Swart, R. L. de;** Ludlow, M.; Witte, L. de; Yanagi, Y.; van Amerongen, G.; McQuaid, S. et al. (2007): Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. In: *PLoS Pathog.* 3 (11), S. e178.
- T Takai, Y.;** Miyoshi, J.; Ikeda, W.; Ogita, H. (2008): Nectins and nectin-like molecules: roles in contact inhibition of cell movement and proliferation. In: *Nat Rev Mol Cell Biol* 9 (8), S. 603–615.
- Takano, A.;** Ishikawa, N.; Nishino, R.; Masuda, K.; Yasui, W.; Inai, K. et al. (2009): Identification of Nectin-4 Oncoprotein as a Diagnostic and Therapeutic Target for Lung Cancer. In: *Cancer Research* 69 (16), S. 6694–6703.
- Takeda, M.;** Tahara, M.; Hashiguchi, T.; Sato, T. A.; Jinnouchi, F.; Ueki, S. et al. (2007): A human lung carcinoma cell line supports efficient measles virus growth and syncytium formation via a SLAM- and CD46-independent mechanism. In: *J. Virol.* 81 (21), S. 12091–12096.
- Takeuchi, K.;** Nagata, N.; Kato, S. I.; Ami, Y.; Suzuki, Y.; Suzuki, T. et al. (2012): Wild-type measles virus with the hemagglutinin protein of the edmonston vaccine strain retains wild-type tropism in macaques. In: *J. Virol.* 86 (6), S. 3027–3037.
- Tamin, A.;** Rota, P. A.; Wang, Z. D.; Heath, J. L.; Anderson, L. J.; Bellini, W. J. (1994): Antigenic analysis of current wild type and vaccine strains of measles virus. In: *J Infect Dis* 170 (4), S. 795–801.
- Tatsuo, H.;** Ono, N.; Tanaka, K.; Yanagi, Y. (2000): SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. In: *Nature* 406 (6798), S. 893–897.
- Tatsuo, H.;** Ono, N.; Yanagi, Y. (2001): Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. In: *J. Virol.* 75 (13), S. 5842–5850.
- Taylor, J.;** Pincus, S.; Tartaglia, J.; Richardson, C.; Alkhatib, G.; Briedis, D. et al. (1991): Vaccinia virus recombinants expressing either the measles virus fusion or hemagglutinin glycoprotein protect dogs against canine distemper virus challenge. In: *J. Virol.* 65 (8), S. 4263–4274.
- V Vandeveld, M.;** Zurbriggen, A. (1995): The neurobiology of canine distemper virus infection. In: *Vet Microbiol* 44 (2-4), S. 271–280.
- Veillette, A.;** Dong, Z.; Latour, S. (2007): Consequence of the SLAM-SAP signaling pathway in innate-like and conventional lymphocytes. In: *Immunity* 27 (5), S. 698–710.

- Visser**, I. K.; van Bressema, M. F.; Swart, R. L. de; van de Bildt, M. W.; Vos, H. W.; van der Heijden, R. W. et al. (1993): Characterization of morbilliviruses isolated from dolphins and porpoises in Europe. In: *J. Gen. Virol.* 74 (Pt 4), S. 631–641.
- Vries**, R. D. de (2013, february 8): Novel insights into measles pathogenesis and immune suppression. In: *Doktorarbeit am Department of Viroscience, Erasmus MC, Rotterdam*. Online verfügbar unter <http://hdl.handle.net/1765/38705>.
- Vries**, R. D. de; Lemon, K.; Ludlow, M.; McQuaid, S.; Yüksel, S.; van Amerongen, G. et al. (2010): In vivo tropism of attenuated and pathogenic measles virus expressing green fluorescent protein in macaques. In: *J. Virol.* 84 (9), S. 4714–4724.
- Vries**, R. D. de; McQuaid, S.; van Amerongen, G.; Yüksel, S.; Verburgh, R. J.; Osterhaus, A. D. M. E. et al. (2012): Measles immune suppression: lessons from the macaque model. In: *PLoS Pathog.* 8 (8), S. e1002885.
- W** **Wass**, M. N.; Kelley, L. A.; Sternberg, M. J. E. (2010): 3DLigandSite: predicting ligand-binding sites using similar structures. In: *Nucleic Acids Res* 38 (Web Server issue), S. W469-73.
- Whelan**, S. P. J.; Barr, J. N.; Wertz, G. W. (2004): Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. In: *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 283, S. 61–119.
- WHO** (2012): Global measles and rubella strategic plan: 2012-2020.
- WHO** (2014): Measles Fact sheet N°286 Updated February 2014. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs286/en/>, zuletzt geprüft am 10.02.2014.
- WHO**; Moss W. J.; Scott S. (2009): The immunological basis for immunization series : module 7: measles - Update 2009.
- Wiener**, D.; Plattet, P.; Cherpillod, P.; Zipperle, L.; Doherr, M. G.; Vandeveld, M.; Zurbriggen, A. (2007): Synergistic inhibition in cell-cell fusion mediated by the matrix and nucleocapsid protein of canine distemper virus. In: *Virus Res.* 129 (2), S. 145–154.
- Witte**, L. de; Abt, M.; Schneider-Schaulies, S.; van Kooyk, Y.; Geijtenbeek, T. B. H. (2006): Measles Virus Targets DC-SIGN To Enhance Dendritic Cell Infection. In: *J. Virol.* 80 (7), S. 3477–3486.
- Wright**, P. J.; Crameri, G.; Eaton, B. T. (2005): RNA synthesis during infection by Hendra virus: an examination by quantitative real-time PCR of RNA accumulation, the effect of ribavirin and the attenuation of transcription. In: *Arch. Virol.* 150 (3), S. 521–532.
- Y** **Yanagi**, Y.; Takeda, M.; Ohno, S. (2006): Measles virus: cellular receptors, tropism and pathogenesis. In: *J. Gen. Virol.* 87 (Pt 10), S. 2767–2779.
- Yoshida**, E.; Iwatsuki, K.; Miyashita, N.; Gemma, T.; Kai, C.; Mikami, T. (1998): Molecular analysis of the nucleocapsid protein of recent isolates of canine distemper virus in Japan. In: *Vet Microbiol* 59 (2-3), S. 237–244.

8. Danksagung

9. Lebenslauf

10. Veröffentlichungen

10.1. Publikationen

- 2013** Bieringer M., Han J.W., Kendl S., Khosravi M., Plattet P., Schneider-Schaulies J. et al. (2013) "Experimental Adaptation of Wild-Type Canine Distemper Virus (CDV) to the Human Entry Receptor 50" PLoS ONE 8(3): e57488. doi:10.1371/journal.pone.0057488

10.2. Präsentationen

10.2.1. Vorträge

- 2013** 23. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Kiel, Deutschland
M. Bieringer, J. Woo Han, S. Kendl, M. Khosravi, P. Plattet, J. Schneider Schaulies
"Experimental Adaptation of Wild-Type Canine Distemper Virus (CDV) to the Human Entry Receptor CD150"
- 2012** 7th ANNUAL MEETING Immunology Training Network of Tübingen, Erlangen and Würzburg in Kloster Schöntal, Deutschland
M. Bieringer, J. Schneider-Schaulies
"Adaptive process in Morbillivirus infection: how canine distemper virus may overcome the species barrier to the human host"
- 2011** XXI. Measles Meeting in Würzburg, Deutschland
M. Bieringer, J. Woo Han, J. Schneider-Schaulies
"Adaptation of canine distemper virus to human host cells"

10.2.2. Poster

- 2013** 8th NETWORK MEETING DFG Doctoral Training & Graduate Programs GK520, GK1660 & IRTG/SFB685 in Obertrubach, Deutschland
M. Bieringer, J. Woo Han, S. Kendl, M. Khosravi, P. Plattet, J. Schneider Schaulies
"Experimental Adaptation of Wild-Type Canine Distemper Virus (CDV) to the Human Entry Receptor CD150"
- 2012** 7th International Symposium by the Graduate School of Life Sciences EPOS in Würzburg, Deutschland
M. Bieringer, J. Woo Han, P. Plattet and J. Schneider-Schaulies
"Adaptation of canine distemper virus to human host cells"

- 2012** 22. Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Essen, Deutschland
M. Bieringer, J. Woo Han, J. Schneider-Schaulies
“Adaptive process in Morbillivirus infection: how canine distemper virus may overcome the species barrier to the human host“
- 2011** 6th ANNUAL MEETING Immunology Training Network of Tübingen, Erlangen and Würzburg in Klosterhospiz Neresheim, Deutschland
M. Bieringer, J. Woo Han, J. Schneider-Schaulies
“Adaptation of canine distemper virus to human host cells”