

Die Bedeutung von Mutationen im Hämagglutinin des Masernvirus für Neurovirulenz und Antikörpererkennung

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

vorgelegt von
Kerstin Möller

aus
Bad Hersfeld

Würzburg, 2002

Eingereicht am:

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender:

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

Gutachter: Professor Dr. Georg Krohne.....

Tag des Promotionskolloquiums:

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die Dissertation "Die Bedeutung von Mutationen im Hämagglutinin des Masernvirus für Neurovirulenz und Antikörpererkennung" selbständig angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

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

Ich habe früher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlich vorgelegten Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Rimpar, den 29. April 2002

(Kerstin Möller)

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung	1
1.1 Epidemiologie und Pathogenese der Masernvirus-Infektion	1
1.1.1 Akute Masernvirus-Infektion	1
1.1.2 Neurotrope Masernvirus-Infektion	2
1.2 Biologie des Masernvirus (MV)	5
1.2.1 Taxonomie	5
1.2.2 Morphologie	6
1.2.3 Funktion der viralen Proteine	6
1.2.4 Genomaufbau und Replikation	9
1.2.5 Rekombinante Masernviren	10
1.3 Zelluläre Rezeptoren für MV	11
1.3.1 Funktion und Vorkommen von CD46	11
1.3.2 Struktur des CD46 und Funktion als MV-Rezeptor	12
1.3.3 CD46 transgene Tiere	13
1.3.4 SLAM – Vorkommen, Struktur und Funktion als MV-Rezeptor	14
1.4 Immunantwort und Bedeutung der Zytokinproduktion bei einer MV-Infektion	15
1.5 Neurovirulenz von MV und Befunde im Tiermodell	16
1.6 Ziele der Arbeit	18
2 Material	19
2.1 Geräte	19
2.2 Verbrauchsmaterialien	20
2.3 Chemikalien	21
2.4 Medien, Lösungen und Puffer	22
2.4.1 Zellkultur	22
2.4.2 Molekularbiologie	24
2.4.3 Proteinbiochemie	25
2.5 Kits	25
2.6 Enzyme	25
2.7 Oligonukleotide (Primer)	26
2.8 Zellen	28
2.9 Antikörper	29
2.9.1 Primärantikörper	29
2.9.2 Sekundärantikörper	29
2.10 Virusstämme	30
2.11 Versuchstiere	30

Inhaltsverzeichnis

3 Methoden	31
3.1 Zellbiologische Methoden	31
3.1.1 Kultur adhärenter Zellen	31
3.1.2 Kultur von Suspensionszellen	31
3.1.3 Kultur von Hybridomzellen zur Antikörpergewinnung	31
3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen	32
3.1.5 Mycoplasmentestung	32
3.1.6 Isolierung primärer Rattenhirnzellen	33
3.1.7 Isolierung von Ratten-Milzzellen	33
3.1.8 Tierversuche	34
3.1.9 Rückkreuzung der CD46 transgenen Ratten auf den genetischen Lewis-Hintergrund	34
3.2 Virologische Methoden	35
3.2.1 Viruspräparation auf adhärenten Zellen	35
3.2.2 Viruspräparation mit Suspensionszellen	35
3.2.3 Viruspräparation des MV-Stamms CAM/RB	36
3.2.4 Titerbestimmung der Viruspräparationen mittels Endpunkttitration	36
3.2.5 Titerbestimmung mittels Plaquetest	37
3.2.6 Plaquereinigung	37
3.2.7 Ultrazentrifugation von Virus-Präparationen zur Einengung	38
3.2.8 Virusbindungs-Assay	38
3.2.9 Infektions-Assay	38
3.2.10 Herstellung rekombinanter Viren	39
3.3 Histochemische Methoden	40
3.3.1 Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflußzytometrie	40
3.3.2 Immunfluoreszenzfärbung für die Mikroskopie	41
3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung für die Histologie	42
3.4 Proteinanalyse	42
3.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen	42
3.4.2 Herstellung von Zelllysaten	42
3.4.3 Herstellung von Gewebelysaten	43
3.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese	43
3.4.5 Western-Blot-Analyse	44
3.4.6 Reinigung von monoklonalen Antikörpern	46
3.4.7 Biotinylierung von monoklonalen Antikörpern	46
3.4.8 Glykosylierungsinhibition der MV-H-Proteine während der Viruszucht	46
3.4.9 EndoglycosidaseH-Verdau von Virus	47
3.5 Molekularbiologische Methoden	47
3.5.1 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen	47
3.5.2 DNA und RNA Gelelektrophorese	48
3.5.3 DNA-Präparation aus Zellen oder Geweben	48
3.5.4 RNA-Präparationen	49
3.5.4.1 RNA-Präparation aus Rattenhirnen für die Zytokinanalyse	49
3.5.4.2 RNA-Präparation aus Viruspräparationen für die Sequenzierung	50
3.5.5 DNaseI-Verdau isolierter RNA aus Gehirnen	51
3.5.6 Reverse Transkription	51
3.5.7 Polymerase-Ketten-Reaktion	52
3.5.8 Sequenzierung	53

Inhaltsverzeichnis

4 Ergebnisse	56
4.1 Charakterisierung der molekularen Grundlagen der Neurovirulenz	56
4.1.1 Grundlagen.....	56
4.1.2 Etablierung des Testsystems zur Identifizierung von Antikörperescape-Mutanten.....	57
4.1.3 Übersicht der rekombinanten Viren.....	58
4.1.4 Charakterisierung der rekombinanten Viren bezüglich Antikörperescape.....	59
4.1.5 Tierversuche zur Neurovirulenz der ersten rekombinanten Viren.....	60
4.1.6 Erste Immunhistologie Ergebnisse.....	62
4.1.7 Sequenzierung der natürlichen Mutanten CAM/K71 und CAM/K29 auf zusätzliche Mutationen.....	63
4.1.8 Charakterisierung der neuen rekombinanten EdtagCAMHmt12 und EdtagCAMHmt13.....	64
4.1.9 Tierversuche der rekombinanten Viren EdtagCAMHmt6 bis EdtagCAMHmt13.....	65
4.1.10 Tierversuch zur Neurovirulenz der natürlichen Mutanten.....	66
4.1.11 Tierversuch mit verschiedenen CAM-Stämmen.....	67
4.1.12 Sequenzierung und Alignment verschiedener MV-Stämme.....	68
4.1.13 Funktionelle Untersuchung der Mutation an Position 200.....	70
4.1.14 Konstruktion von Einzelmutanten.....	73
4.1.15 Analyse des Wachstumsverhaltens dieser Einzelmutanten.....	73
4.1.16 Glykosylierungsanalyse der Einzelrekombinanten durch den Western-Blot.....	75
4.1.17 Tierversuche mit diesen Einzelmutanten zur Bestimmung ihrer Neurovirulenz.....	76
4.1.18 Zusammenstellung der Daten der rekombinanten Viren.....	77
4.1.19 Zusammenstellung der FACS-Analysen mit allen rekombinanten Viren.....	78
4.1.20 Zusammenstellung der Tierversuche.....	79
4.2 Versuche zur Etablierung eines Zellkultursystems, das die Neurovirulenz der unterschiedlichen Viren reflektiert	80
4.2.1 Vorüberlegungen zur Etablierung eines Systems.....	80
4.2.2 Zusammenstellung der getesteten Zellen.....	80
4.2.3 Virusbindungsversuche von unterschiedlichen Viren an verschiedenen Zelltypen.....	81
4.2.4 Infektionsversuche von verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Viren.....	82
4.3 Zytokinnachweis in infizierten Rattenhirnen	83
4.3.1 Grundlagen.....	83
4.3.2 Ergebnisse der PCR-Analyse zum Zytokinnachweis.....	83
4.4 CD46 transgene Lewis-Ratten	87
4.4.1 Rückkreuzen der transgenen Ratten auf Lewis-Ratten.....	87
4.4.2 PCR-Analyse zum Nachweis von CD46.....	88
4.4.3 Western-Blot-Analyse zum Nachweis von CD46.....	89
4.4.4 FACS-Analyse zum Nachweis von CD46.....	90
4.4.5 Infektionsversuche <i>in vitro</i> mit Milzzellen.....	91
4.4.6 Infektionsversuche <i>in vivo</i>	92

Inhaltsverzeichnis

5 Diskussion	93
5.1 Charakterisierung der Mutationen im MV-H-Gen	93
5.2 Mögliche Struktur-Funktionsbeziehungen der Mutationen	97
5.3 Die Etablierung eines Zellkultursystems	100
5.4 Zytokinstatus in unterschiedlich infizierten Rattenhirnen	101
5.5 CD46 transgene Ratten - ein geeignetes Tiermodell?	105
6 Zusammenfassung	108
6.1 Zusammenfassung	108
6.2 Summary	109
7 Literaturverzeichnis	111
8 Abkürzungen	128
9 Lebenslauf	132
10 Veröffentlichungen	133

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Pathogenese der Masernvirus-Infektion

1.1.1 Akute Masernvirus-Infektion

Die akuten Masern sind eine hochansteckende durch Tröpfcheninfektion übertragene Erkrankung, deren ätiologisches Agens das Masernvirus (MV) ist. Bereits eine kurze Exposition (Kontagionsindex nahe 100%) führt zu einer Infektion und löst bei über 95% der Infizierten die Erkrankung aus. Masern sind weltweit verbreitet und aus globaler Sicht ist die Bedeutung der Masern besonders in Entwicklungsländern am größten. Das natürliche Reservoir von MV ist der Mensch, wobei auch einige Primatenarten infiziert werden können. Primär werden die Epithelzellen im Respirationstrakt und die lymphatischen Gewebe infiziert. Nach einer lytischen Virusvermehrung in den lokalen Lymphknoten kommt es zu einer virämischen Phase und einer Verbreitung des Virus im Körper. Über infizierte Monozyten und Makrophagen werden Epithelzellen und Endothelzellen in verschiedenen Organen, wie Leber, Niere, Gastrointestinaltrakt, Lunge und Haut infiziert (Attibele *et al.*, 1993; Esolen *et al.*, 1993; Riley *et al.*, 1978; Ruckle und Rogers, 1957). Während der Virämie entsteht das Exanthem (Esolen *et al.*, 1993; Fulginiti und Kempe, 1965; Moench *et al.*, 1988). Verursacht wird es durch direkte virusbedingte oder toxisch-allergische Permeabilitätssteigerung von Gefäß- und Zellwänden der Haut. Eine Masernvirus-Infektion löst eine effiziente und protektive Immunantwort aus, die zu einer lebenslangen Immunität führt (Panum, 1938). Begleitet wird die Erkrankung von einer generellen Immunsuppression, die bereits 1908 von Pirquet durch das Ausbleiben der Tuberkulinreaktion beschrieben wurde (von Pirquet, 1908). Dieses ist auch der Grund für die hohe Mortalitätsrate, mit knapp einer Million Opfern pro Jahr vor allem in den Entwicklungsländern. Betroffen sind hier besonders Kleinkinder, die

unter Mangelernährung leiden, in unhygienischen Verhältnissen leben und keinen Zugang zu Impfstoffen haben. Ursache für die hohe Sterblichkeit ist eine meist bakterielle oder parasitäre Überinfektion, die von dem unreifen und supprimierten Immunsystem nicht bekämpft werden kann.

Ein weiteres Problem stellt sich bei Säuglingen im Alter zwischen 6 und 12 Monaten durch die maternalen Antikörper ein. Während dieser Zeit werden die maternalen Antikörper abgebaut und das eigene Immunsystem entwickelt sich allmählich. Somit bieten die maternalen Antikörper dem Säugling nicht mehr den richtigen Schutz vor einer Masernvirus-Infektion, sie verhindern jedoch eine Immunisierung durch den bestehenden Impfstoff (Aaby *et al.*, 1993; Garenne *et al.*, 1991). Es besteht während dieser Zeit also keinerlei Schutz gegen eine Masernvirus-Infektion.

Die Masernerkrankung verläuft in 2 klinischen Stadien. Nach einer Inkubationszeit von 10-14 Tagen kommt es zu einem katarrhalischen Stadium (Prodromalstadium), welches durch Fieber, Husten, Schnupfen, Konjunktivitis mit Lichtscheu charakterisiert ist. An der Wangenschleimhaut finden sich weißliche, 1-2mm große, flache Bläschen mit nekrotischer Oberfläche, die Koplikschen Flecken. Das katarrhalische Stadium dauert 3-4 Tage und geht dann in das Exanthemstadium über. Der Ausschlag beginnt hinter den Ohren und breitet sich innerhalb von 1-2 Tagen über den ganzen Körper aus. 1-2 Tage nach dem Auftreten des Hautausschlages gehen Fieber und Schnupfensymptome zurück, das Exanthem hält ca. 10 Tage an. Die hervorgerufene Immunsuppression kann noch Wochen nach Abklingen des Exanthems andauern. Als Komplikation der Masern kann es zu Pseudokrapp, Bronchitis oder einer Bronchopneumonie kommen. Oft werden die Masern auch von einer Otitis media begleitet. Die Ansteckungsfähigkeit beginnt bereits 1-2 Tage vor den sichtbaren Symptomen.

1.1.2 Neurotrope Masernvirus-Infektion

Es werden drei verschiedene neurologische Komplikationen im Gehirn nach einer Masernvirus-Infektion beschrieben: die akute postinfektiöse Masern Enzephalitis (APME), die Masern Einschlusskörperchen Enzephalitis (MIBE) und die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE). Alle diese drei Erkrankungen treten zu verschiedenen Zeitpunkten nach dem Abklingen der typischen Symptome, die die akuten Masern charakterisieren, auf (Karp *et al.*, 1996). Dass das ZNS auch während einer unkomplizierten akuten Masernvirus-Infektion beteiligt ist, zeigen Untersuchungen, worin bei ca. 50% der Patienten vorübergehende Abnormalitäten im EEG auftreten (Gibbs *et al.*, 1959; Hanninen *et al.*, 1980).

Als akute postinfektiöse Komplikation, die ca. 5 bis 14 Tage nach dem Ausschlag einsetzt, kann es zu einer MV Enzephalitis (APME) kommen, dies könnte möglicherweise die Folge einer Autoimmunreaktion im Gehirn sein, da in der Regel kein MV im ZNS nachweisbar ist. Bei 1000 Masernfällen kommt es einmal zur Enzephalitis mit einer Letalität von 10-20% (Duclos und Ward, 1998; Johnson, 1982). Hierbei findet man nach der ersten Entfieberung einen zweiten Fieberanstieg und bei dieser Krankheit wird eine Reaktion gegen das basische Myelinprotein (MBP) ausgelöst, möglicherweise verursacht durch molekularen Mimikry der Myelinproteine durch MV oder eine veränderte Präsentation der Selbst-Antigene nach Oligodendrozyten-Infektion (Jahnke *et al.*, 1985). Anhand von Sequenzanalysen konnten homologe Regionen zwischen MBP und MV-Proteinen nachgewiesen werden (Jahnke *et al.*, 1985).

Zwei weitere neurologische Masernkomplikationen entstehen als Folge einer persistierenden Infektion. Beide sind unheilbar und verlaufen stets tödlich. Die Fragen aber auf welche Weise und zu welchem Zeitpunkt das Virus ins Gehirn gelangt, werden noch kontrovers diskutiert. Die Masern Einschlusskörperchen Enzephalitis (MIBE = measles inclusionbody encephalitis) tritt nur bei immunsupprimierten Patienten ca. 3 bis 6 Monate nach der akuten Masern Erkrankung auf. Das Alter der Erstinfektion variiert stark (Ballart *et al.*, 1991; Carter *et al.*, 1983). Charakteristische klinische Anzeichen der MIBE sind allgemeine fortschreitende neurologische Verschlechterung, einschließlich Epilepsie-Anfällen und eine Veränderung des geistigen Zustands (Norrby und Kristensson, 1997). Pathologische Untersuchungen haben im Kern und Zytoplasma von Neuronen und Gliazellen Einschlusskörperchen nachgewiesen. Es konnte nur in einigen Fällen Virus aus dem Gehirn rückisoliert werden. Eine exakte Diagnose kann nur durch histologische Untersuchung von Biopsie-Material einschließlich der Analyse von viralen Antigenen in den Zellen und von Virus spezifischer RNA durch PCR erstellt werden (Mustafa *et al.*, 1993), nicht durch die Untersuchung von Zerebrospinalflüssigkeit oder durch ein Elektroenzephalogramm (EEG).

Die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) tritt mit einer Häufigkeit von 10^{-5} nach Wildtyp-MV-Infektion (Duclos und Ward, 1998) auf und vor allem bei Personen, die sehr jung (vor dem 2. Lebensjahr) infiziert wurden (Detels *et al.*, 1973; Jabbour *et al.*, 1972) und nicht gegen Masern geimpft waren. Außerdem tritt die SSPE zweimal häufiger bei Jungen als bei Mädchen auf (Vucenovic und Vranjesevic, 1989). Die sehr stark variierende Inkubationsperiode beträgt ca. 5-10 Jahre (Modlin *et al.*, 1977). Die Analyse von Autopsiematerial betroffener Patienten ergab hierbei, dass Neuronen und Gliazellen nukleäre und zytoplasmatische Einschlusskörperchen enthalten, zeigen allerdings weder CPE noch

setzen sie Virus frei. Man vermutet, dass die viralen Ribonukleoproteinkomplexe synaptisch übertragen werden (Iwasaki und Koprowski, 1974; Paula-Barbosa und Cruz, 1981). Sequenz Analysen viraler RNA von unterschiedlichen Stellen eines SSPE Gehirns haben gezeigt, dass die Viren im ZNS klonalen Ursprungs sind, also möglicherweise zu einem Zeitpunkt der akuten MV-Infektion in das ZNS einwanderten, um sich nach und nach im ganzen Gehirn zu verteilen (Baczko *et al.*, 1993). Untersuchungen haben außerdem gezeigt, dass die virale Genexpression auf verschiedenen Ebenen restringiert ist, wobei vor allem Mutationen in den MV-Genen zu finden sind, die mit dem Zusammenbau ("Assembly") und der Knospung der Nachkommen-Virionen interferieren. Die Ursache für das Fehlen einer produktiven Virusvermehrung liegt vermutlich vor allem in dem gehäuften Auftreten von Mutationen in Strukturproteinen, besonders dem Matrixprotein. Untersuchungen an Viren aus unterschiedlichen SSPE Gehirnen zeigten, dass das vorherrschende Virus in jedem SSPE Patienten eine völlig eigene Charakteristik hat und Veränderungen konnten in jedem der drei membranassoziierten viralen Strukturkomponenten dem Matrix-, dem Fusions- und dem Hämagglutininprotein gesehen werden. Einen Überblick über die verschiedenen Formen von genetischen Veränderungen der Viren geben die Zusammenfassungen von Cattaneo und Billeter (1992) und Schneider-Schaulies *et al.* (1992). Auf Grund der Tatsache, dass sich die SSPE in Gegenwart von hohen Titern an MV-Antikörpern in der Zerebrospinalflüssigkeit entwickelt, wurden von Liebert *et al.* (1994) MV-H-Mutanten untersucht. Mit diesen Viren, die in Gegenwart von neutralisierenden anti-MV-H-Antikörpern generiert und dadurch im H-Glykoprotein verändert waren, wurde der Antikörpereinfluss auf die Neurovirulenz im Lewis-Ratten Tiermodell für MV induzierte ZNS Erkrankungen untersucht. Dabei zeigten die verschiedenen Antikörperescape-Mutanten ein unterschiedliches Neurovirulenzverhalten.

Durch eine Masernimpfung kann das Auftreten der SSPE völlig verhindert werden und die akute postinfektiöse MV-Enzephalitis wird auf eine Frequenz von 10^{-6} reduziert (Duclos und Ward, 1998).

1.2 Biologie des Masernvirus (MV)

1.2.1 Taxonomie

Das Masernvirus ist ein negativ-strängiges umhülltes RNA-Virus und gehört zur Ordnung der Mononegavirales, zur Familie der Paramyxoviridae und hier in den Genus Morbillivirus zusammen mit dem Hundestaubevirus (CDV), dem Seehundestaubevirus (PDV-1 und PDV-2), dem Peste des petits ruminants Virus (PPRV), dem Rinderpestvirus (RPV) und dem Delphin und Tümmler Morbillivirus. Möglicherweise entwickelte sich das MV aus dem eng verwandten Rinderpestvirus (McNeill, 1976).

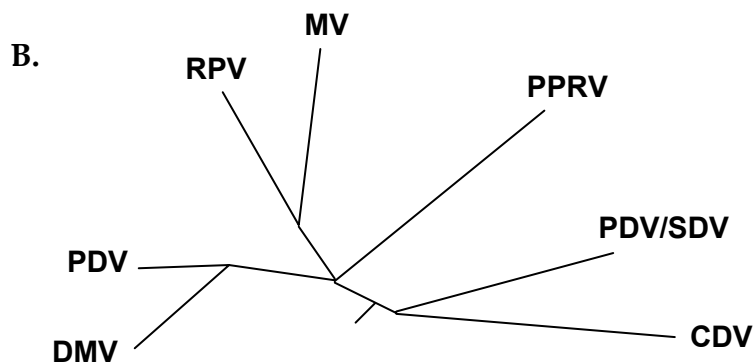
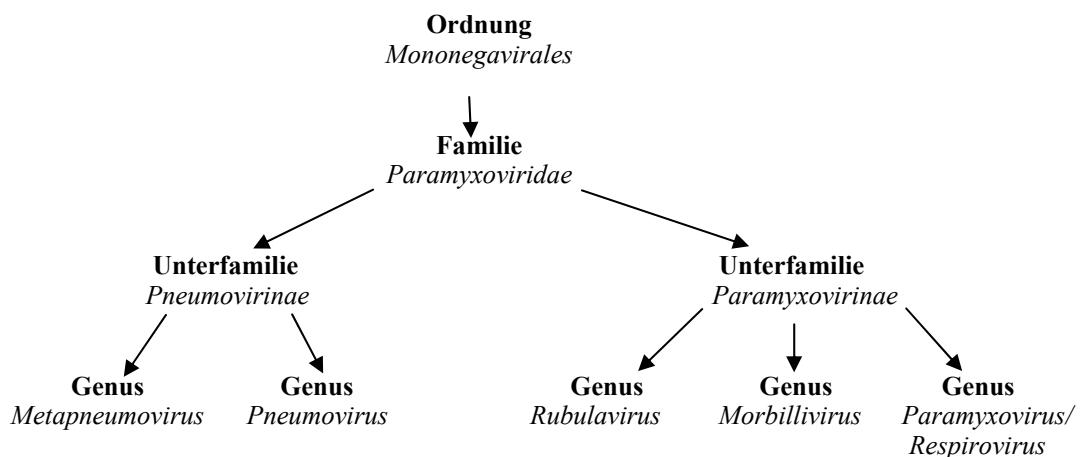


Abb. 1.1: Übersicht über die Taxonomie der Ordnung Mononegavirales und speziell der Familie der Paramyxoviridae. Das MV ist ein Mitglied des Genus der Morbilliviren innerhalb der Unterfamilie der Paramyxovirinae. B. Phylogenetischer Stammbaum der Morbilliviren. MV Masernvirus; CDV canine distemper virus; DMV dolphine morbilli virus; PPRV peste-des-petits-ruminants virus; PDV/SDV phocine/seal distemper virus; PDV porpoise distemper virus; RPV Rinderpestvirus.

1.2.2 Morphologie

MV sind pleomorphe Partikel, die von einer Membranhülle (Envelope) umgeben sind (Miller und Raine, 1979) (Abb. 1.2). Sie bestehen aus den sechs Strukturproteinen Hämagglutininprotein (H), Fusionsprotein (F), Matrixprotein (M), Nukleoprotein (N), Phosphoprotein (P; kleine Untereinheit der RNS-abhängigen RNS-Polymerase) und Largeprotein (L; große Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase) (die in Kap. 1.2.3 genauer beschrieben werden) sowie einer nicht-segmentierten, einzelsträngigen RNA negativer Polarität von ca. 16kb Länge und 21nm Durchmesser. Der Envelope, der von der Wirtszellmembran abstammt, kann durch Hitze, UV-Strahlung, Detergentien oder Ether zerstört werden. Die Hülle entsteht beim Budding (Knospung) aus der Zytoplasmamembran der Wirtszelle, in die virale Hämagglutinin- und Fusionsproteine eingelagert wurden.

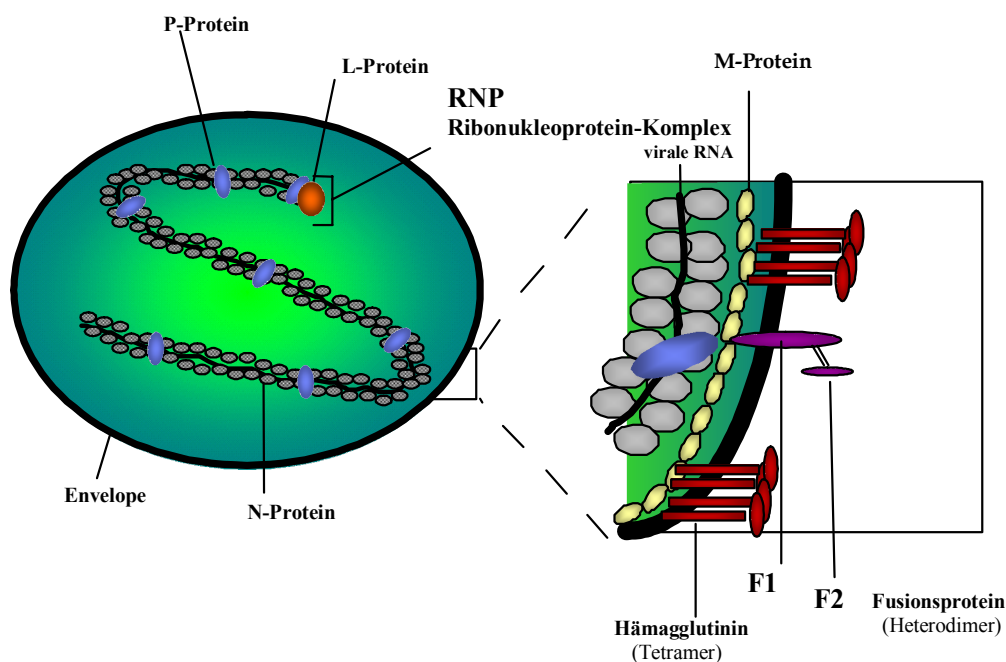


Abb. 1.2: Schematische Darstellung eines Masernvirions

1.2.3 Funktion der viralen Proteine

Das **Nukleoprotein** (N, 60kDa) ist das häufigste aller viralen Translationsprodukte und bildet zusammen mit dem L- und P-Protein den Ribonukleoproteinkomplex aus. Das Nukleoprotein kann sowohl mit viraler mRNA ((+)-RNA) als auch mit genomischer Nukleinsäure ((-)-RNA) assoziieren, was eine essentielle Voraussetzung für Replikation und Transkription darstellt. Über seinen aminoterminalen Bereich lagert sich das N-Protein an die RNA an und verpackt sie dadurch. Diese Verpackung der RNA schützt sie vor dem Abbau durch zelluläre

Nukleasen. Obwohl dem N-Protein selbst keine enzymatische Aktivität nachgewiesen werden konnte, ist eine Transkription ohne das N-Protein nicht möglich. Mit der carboxyterminalen Domäne interagiert das N-Protein mit den Proteinen P und L.

Das **Phosphoprotein** (P, 72kDa) ist weniger häufig als N. Als Teil des RNA-abhängigen Polymerasekomplexes ist P in der Lage, Interaktionen mit N und der mRNA einzugehen und liegt deshalb gehäuft an den transkriptionsaktiven Stellen der genomischen RNA vor. Es wirkt dort als Transaktivator für das **Largeprotein** (L, 200kDa). Dieses Protein ist der katalytische Teil des Polymerasekomplexes und neben der Initiation, Elongation und Termination der RNA-Synthese ist L für das "Capping" und die Polyadenylierung der viralen Transkripte verantwortlich.

Das **Matrixprotein** (M, 38kDa) besitzt basische und hydrophobe Eigenschaften, es ist damit befähigt, mit Nukleocapsid und Plasmamembran zu assoziieren und stellt so die Verbindung zwischen dem RNP-Komplex und der viralen Hülle (Envelope) her und bildet die Proteinschicht an der Membraninnenseite. Vermutlich stabilisiert oder präpariert es die Zellmembran, so dass die virale Knospung (Budding) stattfinden kann. Bindet es an den RNP-Komplex, so wird die Transkription inhibiert (Suryanarayana *et al.*, 1994). Von Cathomen *et al.* (1998) wurde anhand eines rekombinanten M-defizienten EdmB-Virus eine fusionsregulierende Wirkung beschrieben. Außerdem ist das M-Protein am Assembly der Viruspartikel beteiligt. Bei persistierenden MV-Infektionen wie SSPE und MIBE wurden Mutationen insbesondere im M-Gen beobachtet.

Das **Hämagglutininprotein** (H, 80kDa) ist ein Typ II - TM-Protein und wird als Disulfid-verknüpftes Dimer im Golgi-Apparat hergestellt und als Tetramer auf der Oberfläche exprimiert (Malvoisin und Wild, 1993). Das Hämagglutinin ist für die Bindung an zelluläre Rezeptoren verantwortlich und es wird für H eine Fusionshelferfunktion postuliert, deren Resultat die optimale F-Positionierung im Rezeptor-H-F-Komplex darstellt (Buchholz *et al.*, 1996), da nur die Doppelexpression von F und H zur Synzytienbildung führt. Der Name rührt von der Möglichkeit her *in vitro* eine Hämagglutination von Affenerythrozyten herbeizuführen, da sie im Gegensatz zu humanen Erythrozyten CD46 auf der Zelloberfläche tragen, das mit dem Hämagglutinin der MV-Vakzinestämme interagiert. Das H-Protein besitzt eine hydrophobe Sequenz am aminoterminalen Ende, die als Signalsequenz zum Transport des Proteins in das Endoplasmatische Retikulum (ER) dient. H wird im rauhen ER synthetisiert und glykosyliert und dann als Dimer zweier Moleküle, die über Disulfidbrücken miteinander verbunden sind, zum Golgi-Apparat transportiert. Dort werden die Zuckerreste modifiziert und H wird zur Zytoplasmamembran der Wirtszelle transportiert und gelangt so in den viralen

Envelope. Es gibt fünf bis sechs Glykosylierungsstellen, deren Benutzung notwendig ist, um das Protein richtig zu falten, zu dimerisieren und aus dem Golgi-Apparat zu exportieren (Hu *et al.*, 1994). Viren, die persistente Infektionen verursachen, enthalten oft Hämagglutinine mit Mutationen, die Glykosylierung, Oligomerisierung und intrazellulären Transport betreffen (Cattaneo und Rose, 1993).

Das **Fusionsprotein** (F, 60kDa) ist ein Typ I glykosyliertes Transmembranprotein und dient der Verschmelzung des viralen Envelope mit der Zytoplasmamembran der Zielzelle, wozu aber zusätzlich die Anwesenheit von MV-H notwendig ist (Wild *et al.*, 1991). Das F-Protein wird als inaktives Vorläuferprotein (F₀, 60kDa) im ER synthetisiert und glykosyliert. Durch eine Endoprotease (vorwiegend Furin) wird das F₀-Protein im Golgi-Apparat in zwei Untereinheiten F₁ (40kDa) und F₂ (20kDa) gespalten, die über eine Disulfidbrücke verbunden bleiben. Die F₁ Untereinheit entstammt dem carboxyterminalen Ende des F₀-Proteins und ist in der Virushülle verankert. Das aminoternale Ende des F₁ enthält das fusionsaktive Peptid (Richardson *et al.*, 1986), eine hydrophobe Region, die bei Paramyxoviren hoch konserviert ist. Die extrazelluläre Region von F₁ besitzt in der Nähe der Transmembrandomäne ein Leuzinzippermotiv sowie eine cysteinreiche Region. Oligopeptide mit hoher Homologie zu diesem Bereich sind in der Lage, die Fusion des MV zu inhibieren (Richardson *et al.*, 1986; Richardson und Choppin, 1983). Das F-Protein wird an der Oberfläche als Homotrimer exprimiert (Malvoisin und Wild, 1993; Russel *et al.*, 1994). Die F₂ Untereinheit enthält drei N-Glykosylierungsstellen, die für die Reifung, Spaltung und Funktion des F-Proteins notwendig sind (Hu *et al.*, 1995).

1.2.4 Genomaufbau und Replikation

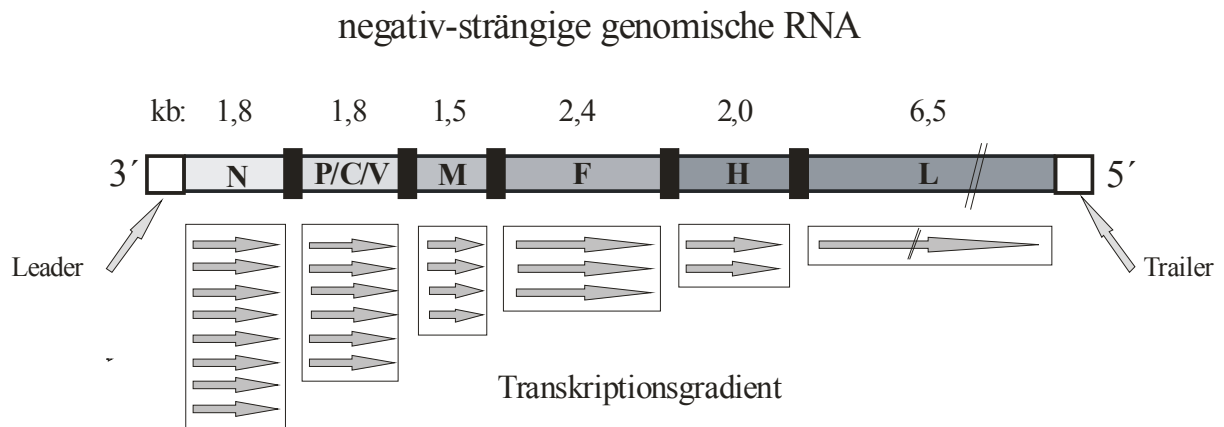


Abb. 1.3: Schematische Darstellung des Genoms und der Transkriptionsstrategie des MV. Das MV-Genom beginnt mit einer Leadersequenz am 3'-Ende und endet mit einer Trailersequenz am 5'-Ende (weiße Kästchen). Zwischen den Genen für die Strukturproteine (grau) liegen die intergenischen Regionen (schwarze Balken) an denen es zur Termination der Transkription kommen kann. Die Pfeile geben den Transkriptionsgradienten wieder.

Das Genom des Masernvirus ist nicht segmentiert und hat eine Länge von ca. 16kb. Am 3'-Ende des Genoms befindet sich eine als Leader bezeichnete kurze Sequenzfolge, die nicht für Aminosäuren kodiert. Am 5'-Ende befindet sich ein als Trailer bezeichneter, nicht-transkribierter Bereich, in dem die cis-aktiven Initiationssignale für den Start der Synthese neuer Genomstränge während der Virusreplikation liegen. Der Leadersequenz folgen die sechs nicht überlappenden viralen Strukturgene in der Reihenfolge 3' N-P-M-F-H-L 5' (Abb. 1.2.4). Durch Verschiebung des Leserasters können innerhalb des P-Genes noch zwei weitere nichtstrukturelle Proteine, C und V, exprimiert werden, wobei die Funktion dieser beiden Proteine noch weitestgehend unbekannt ist. Die Leadersequenz dient der Anlagerung des Polymerasekomplexes und damit der Initiation der Transkription im Zytoplasma der Wirtszelle. Zwischen den proteinkodierenden Sequenzen befinden sich jeweils kurze intergenische Sequenzen, die nicht für Proteine kodieren. Diese Consensussequenzen sind konservierte Tripeptide mit der Sequenz C - U/G - U. Diese intergenischen Trinukleotid-Sequenzen können sowohl zur Beendigung der Transkription genutzt als auch zur Synthese bi- oder polyzistronischer Transkripte überlesen werden. Das Überspringen dieser intergenischen Sequenzen und erneuter Transkriptionsstart führt zu 6 verschiedenen mRNAs, die „gecappt“ und polyadenyliert werden. Andererseits kann an den intergenischen Sequenzen auch der Polymerase-Komplex von der Matrize abfallen, wodurch es zum Abbruch der Transkription kommt. Je weiter ein Protein vom 3'-Ende entfernt ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer verfrühten Termination. Es entsteht dadurch ein Transkriptionsgradient (Abb. 1.3) von 3'

nach 5', was nach Translation zu einer großen Menge des strukturell benötigten N-Proteins (zur Enkapsidierung des Genoms) und einer sehr geringen Menge des L-Proteins führt (Cattaneo *et al.*, 1987; Schneider-Schaulies *et al.*, 1990).

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

Die Umschaltung von der Transkription subgenomischer mRNAs zur Replikation des MV-Genoms wird durch die Verfügbarkeit des N-Proteins gesteuert (Blumberg *et al.*, 1981). Hierzu überliert der Polymerase-Komplex die intergenischen Sequenzen und synthetisiert zunächst die positivsträngige, antigenomische RNA (replikatives Intermediat), um anschließend, ausgehend von der 5'-gelegenen Trailer-Region, die negativsträngige genomische RNA zu generieren. Die genomische RNA wird zum Schutz vor zellulären Proteasen unmittelbar während der Synthese vom N-Protein komplexiert und mit L- und P-Proteinen zu RNP-Komplexen zusammengesetzt. Die neu synthetisierten viralen Hüllproteine H und F werden in die Membran der infizierten Zelle inseriert und ermöglichen nach M-Protein vermittelter Kontaktierung des RNP-Komplexes das Verlassen der Zelle durch Knospung oder Lyse der Zelle.

1.2.5 Rekombinante Masernviren

Der erfolgreiche erstmals 1995 beschriebene Rescue von klonierten Masernviren (Radecke *et al.*, 1995) eröffnete eine völlig neue Dimension der Erforschung von Fragestellungen bezüglich gezielter Veränderungen im Virusgenom. So sind an nur einigen wenigen nachfolgenden Beispielen die neuen Forschungsmöglichkeiten aufgezeigt, die erst durch rekombinante MV realisierbar wurden. Auch das Gen für das grün-fluoreszierende Protein (GFP = Green Fluorescent Protein) ist in das Masernvirusgenom kloniert worden, um den Infektionsverlauf durch Expression des GFP im Fluoreszenz-Mikroskop verfolgen zu können, gezeigt am Beispiel der Infektion von humanen Oligodendrogliomzellen (Plumb *et al.*, 2002), von einer humanen Astrozytom-Zelllinie (Duprex *et al.*, 1999) oder von einer undifferenzierten Maus Neuroblastom-Zelllinie (Duprex *et al.*, 2000). Weiterhin konnte mit Hilfe der heterologen Expression der beiden Glykoproteine H und F verschiedener MV Stämme gezeigt werden, dass das Hämagglutininprotein bei der Infektion von humanen Dendritischen Zellen *in vivo* eine entscheidende Rolle spielt (Ohgimoto *et al.*, 2001). Von Patterson *et al.* (2001) wurde mit Hilfe von rekombinanten MV der Einfluss von Mutationen

im M-Protein auf die Infektiosität und die Ausbreitung im Gehirn CD46 transgener Mäuse und in Zellkultur untersucht. Es können Untersuchungen, wie in dieser Arbeit, zu Auswirkungen von gezielt eingefügten Punktmutationen in das MV-H-Gen durchgeführt werden. Es konnten weiterhin mit Hilfe der rekombinanten MV diejenigen Aminosäuren charakterisiert werden, die für die Bindungen von einzelnen anti-MV-H-Antikörpern an das Hämagglutininprotein verantwortlich sind (Moeller *et al.*, 2001; diese Arbeit). Es ist auch der Fragestellung nachgegangen worden, ob man mit rekombinanten MV, die heterologe Antigene anderer Viren tragen, neue Impfstoffe entwickeln kann (Wang *et al.*, 2001).

1.3 Zelluläre Rezeptoren für MV

1993 wurde von zwei verschiedenen Arbeitsgruppen auf unterschiedlichen Wegen CD46 als MV-Rezeptor identifiziert (Dörig *et al.*, 1993; Naniche *et al.*, 1993). Das CD46 Molekül muss jedoch, um als Rezeptor geeignet zu sein, an den richtigen Stellen glykosyliert sein (Maisner *et al.*, 1994). Die Bindungsstelle, mit der das virale Hämagglutinin Protein an CD46 bindet, wurde inzwischen auf einige Aminosäuren genau in den ersten beiden SCR Domänen des CD46 lokalisiert (Buchholz *et al.*, 1997). Neben CD46 wurde erstmals im Jahre 2000 SLAM (= signaling lymphocyte activation molecule, CD150) als weiterer MV-Rezeptor insbesondere für Wildtypisolate beschrieben (Tatsuo *et al.*, 2000) und von Erlenhoefner *et al.* nur wenig später durch eine andere Art der Identifizierung als MV-Rezeptor bestätigt (Erlenhoefner *et al.*, 2001).

1.3.1 Funktion und Vorkommen von CD46

CD46 oder auch Membran Cofaktor Protein (MCP) genannt, gehört zur Proteinfamilie der Komplementrezeptoren (regulators of complement activation = RCA). Es wird auf dem humanen Chromosom 1q32 codiert. CD46 ist in der Lage Faktoren des Komplements C3b, C3d und/oder C4b zu binden und deren Spaltung durch den Faktor I, eine Serin Protease des Plasmas, zu fördern und so körpereigene Zellen vor der Lyse durch das eigene Komplementsystem zu schützen (Liszewski *et al.*, 1991; Loveland *et al.*, 1993). CD46 wird ubiquitär auf allen humanen Körperzellen mit Ausnahme der Erythrozyten exprimiert. Auf Granulozyten und Lymphozyten liegt die Kopienzahl bei 5 bis 10×10^3 Molekülen pro Zelle, bei Blutplättchen nur bei 700 bis 2500. Epithelzellen können über 5×10^5 Kopien tragen, einige Tumorzellen sogar 1×10^6 (Seya *et al.*, 1990). Auch auf Zellen anderer höherer Primaten, wie Schimpansen und Gorillas wird CD46 exprimiert. Bei Alt- und Neuweltaffen,

wie Orang-Utans, Makaken und afrikanischen grünen Meerkatzen wird CD46 sogar auf Erythrozyten exprimiert. Diese Eigenschaft wird für die Hämagglutinationstests genutzt.

1.3.2 Struktur des CD46 und Funktion als MV-Rezeptor

Die Sequenz des CD46-Gens ist über 43kb groß und enthält 14 Exons. Exon 1 codiert für die Signalsequenz (leader), gefolgt von den 4 Komplement-Kontroll-Protein Domänen (SCR1-4 = short consensus repeats, 251AS), die von den Exons 2-6 codiert werden. Die Exons 7-9 codieren für die ein bis drei stark O-glykosylierten Serin-Threonin-Prolin-reichen Domänen (STPA, STPB, STPC, 44 AS). Das Exon 10 codiert für eine Sequenz mit unbekannter Signifikanz (UK, 13AS). Exon 11 und 12 codieren für die Transmembran-Domäne (34AS) und die Exons 13 und 14 schließlich für den zytoplasmatischen Schwanz, der durch alternatives Spleißen in zwei Varianten exprimiert werden kann (Cyt1 mit 16 AS und Cyt2 mit 23 AS). Jeder Mensch exprimiert mehrere höhermolekulare und mehrere niedermolekulare Isoformen des CD46, und das Verhältnis der Expressionsmenge dieser beiden Isoformen zueinander wird autosomal dominant vererbt. Die Exons 7 und 8, die für die STPA, STPB und STPC Domänen codieren, können alternativ gespleißt werden. Die Expression von STPB führt zur Expression der höhermolekularen Variante mit 66kDa, das Fehlen von STPB in den Isoformen führt zur niedermolekularen Variante mit 56kDa (Liszewski *et al.*, 1991 und 1994; Manchester *et al.*, 1994).

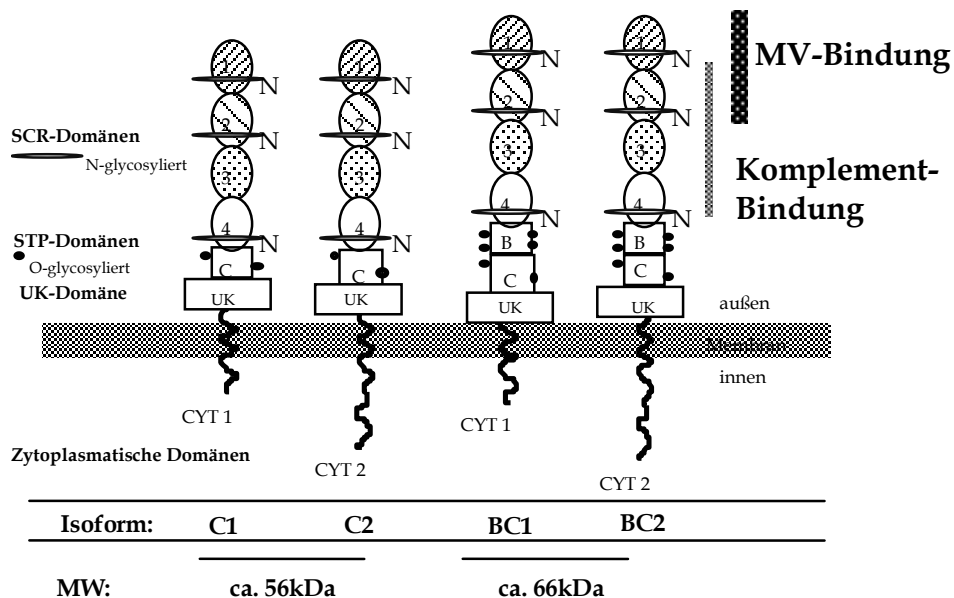


Abb. 1.4: Struktur der vier Hauptisoformen von CD46 (Liszewski *et al.*, 1994). MV bindet an die äußeren SCR1+2 Domänen, die Komplementfaktoren binden an die SCR2-4 Domänen.

Während einer MV-Infektion bindet das H-Protein an CD46 und kann dann rezeptorvermittelt in die Zelle gelangen (Buchholz *et al.*, 1996; Devaux *et al.*, 1996; Maisner *et al.*, 1994; Manchester *et al.*, 1994). Abhängig vom benutzten MV-Stamm wird das CD46-Protein von der Zelloberfläche herunterreguliert (Krantic *et al.*, 1995; Naniche *et al.*, 1993; Schneider-Schaulies *et al.*, 1995). Obwohl CD46 in verschiedenen Isoformen je nach Spleißtyp in verschiedenen Geweben exprimiert wird, sind alle in der Lage als Rezeptor zu fungieren (Gerlier *et al.*, 1994; Manchester *et al.*, 1994; Varior-Krishnan *et al.*, 1994). Weil CD46 auf allen Zellen von Menschen und Affen exprimiert wird, lassen sich entsprechende Zelllinien mit MV-Impfstämmen infizieren (Dörig *et al.*, 1994).

1.3.3 CD46 transgene Tiere

Die Untersuchung von Pathogenitätsmechanismen wurde bisher durch das Fehlen eines kostengünstigen Kleintiermodelles erschwert. Es konnte zwar gezeigt werden, dass in Hamstern (Burnstein *et al.*, 1963), Mäusen (Griffin *et al.*, 1974; Niewiesk *et al.*, 1993) und in Ratten (Liebert und ter Meulen, 1987) eine Enzephalitis, mit einem nageradaptierten neurotrophen MV-Stamm induziert werden kann, doch sind in diesen Tiermodellen die Rezeptoren für MV nicht bekannt. Diese oben genannten Tiere können nicht auf der intranasalen Route (der natürlichen) infiziert werden. Aber es gelang mit Baumwollratten (*Sigmodon hispidus*) ein Nagertiermodell zu etablieren (Niewiesk, 1999), in dem MV nach intranasaler Infektion in der Lunge replizieren (Niewiesk, 1999; Wyde *et al.*, 1992). Um besser geeignete Kleintiermodelle zu erhalten, wurden CD46-transgene Mäuse und Ratten hergestellt. Es wurde jedoch gefunden, dass die Expression von CD46 nicht den intrazellulären Block der Virus Replikation überwinden kann (Niewiesk *et al.*, 1997). Spezielle Untersuchungen zur Ausbreitung der Viren im Gehirn dieser Tiere wurden nicht durchgeführt. Neben der Herstellung von CD46 transgenen Ratten wurden auch verschiedene CD46 transgene Mauslinien hergestellt. Mit diesen transgenen Tieren wurden spezifische Untersuchungen zur Infektion, Virusausbreitung, Immunantwort, Replikation, Einfluss der Virusproteine und Virusfreisetzung im Gehirn, im Hinblick auf die drei durch MV induzierten humanen ZNS Erkrankungen, durchgeführt (Blixenkron-Moller *et al.*, 1998; Duprex *et al.*, 2000; Evlashev *et al.*, 2000; Lawrence *et al.*, 1999; Lawrence *et al.*, 2000; Manchester *et al.*, 1999; Mrkic *et al.*, 1998; Oldstone *et al.*, 1999; Patterson *et al.*, 2000; Patterson *et al.*, 2001 Rall *et al.*, 1997).

1.3.4 SLAM – Vorkommen, Struktur und Funktion als MV-Rezeptor

Das costimulatorische Molekül SLAM (CD150) ist ein glykosyliertes Transmembranprotein und wird auf aktivierten T- und B-Lymphozyten, Gedächtniszellen und Dendritischen Zellen exprimiert (Cocks *et al.*, 1995; Ohgimoto *et al.*, 2001; Polacino *et al.*, 1996; Punnonen *et al.*, 1997). Es gehört zur CD2 Untergruppe der Immunglobulin Superfamilie. SLAM ist ein Selbstligand (Cocks *et al.*, 1995; Mavaddat *et al.*, 2000; Punnonen *et al.*, 1997). Die Bindung von SLAM verstärkt die T-Zell Proliferation und löst die Produktion von IFN-gamma aus (Aversa *et al.*, 1997; Carballido *et al.*, 1997; Cocks *et al.*, 1995). Bei B-Zellen fördert die SLAM-Bindung die Proliferation und die Synthese und Sekretion von Immunglobulinen (Punnonen *et al.*, 1997). Die biologische Wichtigkeit von SLAM wird dadurch unterstrichen, dass Mutationen im oder Deletionen von dem SLAM assoziierten Protein (SAP) einen schweren Immundefekt, die X-gekoppelte Lymphoproliferative Erkrankung (XLP), hervorrufen (Coffey *et al.*, 1998; Nichols, 2000; Sayos *et al.*, 1998).

SLAM ist ein ca. 70kDa großes Protein. Eine schematische Abbildung von SLAM ist in Abb. 1.3.4 gezeigt:

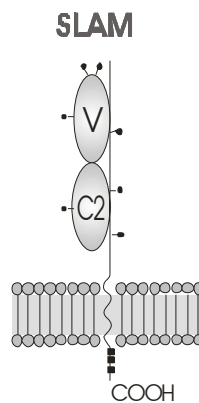


Abb. 1.5: Schematische Struktur von SLAM

SLAM besitzt zwei hoch konservierte Immunglobulin Superfamilien Domänen deren strukturelle Ähnlichkeiten es der CD2-Familie zuweisen. Wie die anderen Mitglieder der CD2-Familie besitzt SLAM einen N-terminalen membranfernen V-Bereich und einen membrannäheren C2-Bereich, gefolgt von dem Transmembran- und dem Cytoplasmatischen-Bereich. Von Ono *et al.* (2001) wurde beschrieben, dass die V-Domäne essentiell für die Funktion als MV-Rezeptor ist. Wie schon für CD46 beschrieben wird auch SLAM sehr effizient von der Zelloberfläche nach Infektion oder Kontakt mit MV herabreguliert (Erlenhoefer *et al.*, 2001; Tanaka *et al.*, 2002).

1.4 Immunantwort und Bedeutung der Zytokinproduktion bei einer MV-Infektion

Zu Beginn einer Infektion setzt das Immunsystem gegen Pathogene zuerst unspezifische Abwehrmechanismen ein. Durch Chemokine und proinflammatorische Zytokine werden an den Ort der Entzündung phagozytierende Zellen (Granulozyten, Makrophagen, Dendritische Zellen) sowie natürliche Killerzellen (NK-Zellen) gelockt und aktiviert. Gerade bei Infektionen mit RNA-Viren wird TypI-Interferon (IFN) freigesetzt, das in umliegenden/benachbarten nicht-infizierten Zellen einen antiviralen Status induzieren kann (Stark *et al.*, 1998). Die Reaktivität von NK-Zellen bei akuten Masern scheint reduziert zu sein (Griffin *et al.*, 1990a). Des Weiteren existieren widersprüchliche Daten über die Induktion von IFN nach Vakzinierung oder während akuter Masern (Crespi *et al.*, 1988; Petralli *et al.*, 1965; Shiozawa *et al.*, 1988; Tilles *et al.*, 1987).

Der Beginn der klinischen Symptome einer MV-Infektion stimmt mit dem Einsetzen der spezifischen Immunantwort überein. Allgemein scheint die zellvermittelte T-Zell-basierende Immunantwort gegenüber der humoralen B-Zell-basierenden für die Beherrschung der MV-Infektion von größerer Bedeutung zu sein (Good und Zak, 1956; Weissbrich *et al.*, 2001). Mit Beginn des Exanthems werden erhöhte Plasmawerte an löslichen T-Zellplasmamembranproteinen gefunden (Griffin *et al.*, 1989; Griffin *et al.*, 1990b; Griffin *et al.*, 1992), einhergehend mit einer starken zytotoxischen Reaktion der CD8⁺-T-Zellen (Van Binnendijk *et al.*, 1990). Bereits vor Einsetzen des Ausschlags steigt der Plasmaspiegel für IFN-alpha an, gefolgt von IL-2 (Griffin *et al.*, 1990b). Nach Abklingen des Ausschlags steigen die Plasmawerte für IL-4 an (Griffin und Ward, 1993) und bleiben für einige Wochen erhöht. Dieser Wechsel der vorherrschenden Zytokine im Plasma könnte ein Indiz für einen Wechsel der Polarisierung der MV-spezifischen Immunantwort sein. Mit Beginn der Immunreaktion gegen MV wird eine T_H1-Polarisierung gefunden, die unter anderem die zelluläre Reaktion gegen MV unterstützt, zum Ende der akuten Masern mit nachlassendem Ausschlag findet man T_H2-typische Zytokine, wie IL-4, IL-5 und IL-10 (Griffin, 1995). Dieses Bild des Wechsels in der Polarisierung der T-Zellantwort ist allerdings umstritten (Schneider-Schaulies *et al.*, 2001; Schnorr *et al.*, 2001).

Die humorale MV-spezifische Immunantwort setzt ebenfalls während des Exanthems ein. Sie ist charakterisiert durch das Auftreten von Immunglobulin (Ig) G₁ und IgG₄ (Mathiesen *et al.*, 1990). Möglicherweise helfen die MV-spezifischen Antikörper (Ak) bei der endgültigen Eliminierung MV-infizierter Zellen und schützen langfristig vor Reinfektionen mit MV (Black, 1989; Varsanyi *et al.*, 1984). Unter den MV-Proteinen ist das N-Protein das

immunogenste, gefolgt von MV-H und -F, die neutralisierende Ak induzieren (Graves *et al.*, 1984).

Da wenig über die Mechanismen bekannt ist, die zur zellulären Fehlfunktion bei der Persistenz von MV im Gehirn (bei MIBE und SSPE) führen, wurden in diesem Zusammenhang die durch die infizierten Gehirnzellen exprimierten Zytokine untersucht. Diese könnten bei der Pathogenese, nicht nur während der anfänglichen Infektion, sondern auch bei der Virusausbreitung, der viralen Genexpression, der Gehirnzellfunktion und der Immunantwort im Gehirn eine entscheidende Rolle spielen (Schneider-Schaulies *et al.*, 1993). So wurde die Rolle von IFN-alpha und beta (Joncas *et al.*, 1976), IFN-gamma und TNF-alpha (Hofman *et al.*, 1991) untersucht. Von Schneider-Schaulies *et al.* (1993) wurden Zytokininduktionen (IL-1, IL-6, IFN-beta, TNF-alpha) während der primären und persistenten MV-Infektion von humanen Hirnzelllinien analysiert. Am Beispiel der Morbillivirus-Infektion im Maus ZNS Modell wurde die Induktion und Korrelation der Zytokinexpression u.a. von TNF-alpha, IL-6, IL-4 und IL-10 gezeigt (Khuth *et al.*, 2001). Besondere Beachtung findet die Unterdrückung der IL-12 Produktion bei der MV-Infektion, was als ein Faktor für die Immunsuppression diskutiert wird (Karp *et al.*, 1996; Polack *et al.*, 2002). Es wurde auch der unterschiedliche Einfluss von IL-12 bei der Entstehung von autoimmun- und virus-induzierter ZNS Demyelinisierung im Mausmodell beschrieben (Bright *et al.*, 1999). Von McQuaid *et al.* (1997) wurde die Expression von LIF mRNA in Gehirnen von SSPE-Patienten untersucht und dort zum ersten Mal deren Expression beschrieben.

1.5 Neurovirulenz von MV und Befunde im Tiermodell

Zuerst ist zur Verdeutlichung der Besonderheit des Gehirns zu sagen, dass es das einzige Organ mit hoch spezialisierten Zellen - den Neuronen - ist, die, wenn sie einmal zerstört wurden, zum größten Teil nicht wieder durch Zellteilung ersetzt werden können. Infolgedessen führt der durch Viren direkt oder indirekt induzierte Zelltod in diesem Organ zu irreparablen Schäden. Das Gehirn kann durch seinen eigenen strukturellen, funktionellen und metabolischen Charakter auf spezielle Weise die Interaktion von Virus und Gewebe unterstützen und möglicherweise ist dadurch eine persistente Infektion prädisponiert (Johnson, 1982; Kristensson, 1986). Folgende Faktoren können zum Auftreten von persistenten Virus-Infektionen im ZNS beitragen: -bestimmte metabolische Eigenschaften neuroectodermaler Zellen können zu Einschränkungen der Virusreplikation in ausgewählten Wirtszellen führen, -

das Netzwerk der sich ausbreitenden Zellen kann zur Verbreitung von produktiven und nichtproduktiven (defekten) Infektionen führen, -die Blut-Hirn-Schranke begrenzt den Zugriff von Immunabwehrmechanismen und normalerweise findet im Gehirn kaum eine Antigenpräsentation statt. Durch Aktivierung von ZNS-Zellen mit Interferonen kommt es jedoch zur verstärkten Expression von MHC-Klasse-I und bei einigen Zelltypen auch von MHC-II-Molekülen. Viele humanpathogene Viren können das Gehirn durch Überquerung der Blut-Hirn-Schranke nach der virämischen Ausbreitung oder durch fortschreitende axonale Ausbreitung erreichen (z.B. Poliovirus - Wyatt, 1976; HIV-1 - Nottet *et al.*, 1997). Innerhalb des Nervensystems können sie eine Meningitis (Hirnhautentzündung) oder eine Enzephalitis (Gehirnentzündung) hervorrufen.

Das Masernvirus ist eigentlich kein hoch neurotropes Virus im Vergleich zu CDV, aber durch die unterschiedlichen Formen der Induktion von Gehirnschädigungen, die das Virus verursachen kann (Griffin und Bellini, 1996), ist es gut geeignet die verschiedensten Virus Wirt Interaktionen im Nervengewebe aufzuzeigen. Die verschiedenen Reaktionen des Immunsystems (vergleiche Kapitel 1.4) beeinflussen die verschiedenen Formen der Gehirnerkrankungen, die durch Masernviren verursacht werden.

Im Tiermodell konnten verschiedene Formen von ZNS-Erkrankungen beobachtet werden, die zum einen vom Alter der Tiere bei der Infektion und zum anderen vom genetischen Hintergrund der Inzuchttiere abhängig sind. Es wurden Unterschiede nach intracerebraler MV-Infektion zwischen Lewis und "brown Norway" Ratten beobachtet (Liebert und ter Meulen, 1987). Unmittelbar nach der Geburt infizierte (neugeborene) Ratten sterben an einer schnell verlaufenden akuten Enzephalopathie (AE). Mit zunehmendem Alter entwickeln Lewis-Ratten (3 bis 4 Wochen alte Tiere, nach der Entwöhnung) eine subakute Masern-Enzephalitis (SAME). Im Gegensatz zu den Lewis-Ratten entwickeln entwöhnte "brown Norway" Jungrenten keine klinischen Anzeichen, obwohl durch histopathologische Untersuchungen eine klinisch inapparente Enzephalitis (CSE = clinically silent encephalitis) dokumentiert werden kann (Liebert und ter Meulen, 1987; Liebert *et al.*, 1990).

Da sich bei SSPE-Patienten hohe Titer von anti-MV-Antikörpern in der Zerebrospinalflüssigkeit nachweisen lassen, wurde ein Einfluss der Antikörper auf die Selektion von neurotrophen MV-Varianten vermutet. In der Veröffentlichung von Liebert *et al.* (1994) wurden MV-Antikörperescape-Mutanten beschrieben, die ein unterschiedliches Neurovirulenzverhalten zeigten. Die Mutationen in den Hämagglutinin-Genen, die zum Verlust der Antikörperbindungsfähigkeit führten, waren dadurch induziert worden, dass die Viren unter dem Selektionsdruck der jeweiligen monoklonalen neutralisierenden anti-MV-H-

Antikörper gezüchtet worden waren. Der Einfluss der durch die Antikörper veränderten MV-Hämagglutinine auf die Infektiosität im Gehirn von Lewis-Ratten wurde untersucht, weil zuvor bei anderen Virus-Wirt Systemen der starke Einfluss von strukturellen Veränderungen der Glykoproteine auf Tropismus und Pathogenität beschrieben wurde (Mims, 1989).

1.6 Ziele der Arbeit

Ziel dieser Arbeit war es mit Hilfe von rekombinanten Viren den möglichen Zusammenhang zwischen Antikörperescape und Neurovirulenz zu untersuchen, der 1994 von Liebert *et al.* impliziert wurde. Da aus den beschriebenen Sequenzanalysen nicht zu beurteilen war, welche Mutation für den Antikörperescape, und welche für die Neurovirulenz verantwortlich ist und ob ein Zusammenhang zwischen Antikörperescape und dem Auftreten des neurovirulenten Verhalten besteht, sollte dies in dieser Arbeit mit Hilfe der rekombinanten MV geklärt werden. Dabei war es möglich mit den gezielt eingefügten Punktmutationen im MV-Hämagglutinin-Gen die Auswirkung jeder einzelnen Mutation, sowohl auf ihr Verhalten den neutralisierenden Antikörpern gegenüber als auch auf ihr Neurovirulenzverhalten im Lewis-Ratten Tiermodell zu untersuchen.

Zur Aufklärung des Einflusses des Immunsystems und speziell der Rolle der Zytokine im Gehirn (vergleiche Kapitel 1.4) während einer MV-Infektion, sollte in dieser Arbeit anhand der Zytokinuntersuchungen gezeigt werden, welche Zytokine in den verschiedenen infizierten Rattenhirnen induziert werden, und ob es einen Unterschied bei der Induktion durch unterschiedlich neurovirulente Viren gibt.

Ferner sollte ein Zellkultursystem etabliert werden, mit dem es *in vitro* möglich ist, die Mechanismen zum unterschiedlichen Neurovirulenzverhalten der Viren aufzuklären.

Mit Hilfe der CD46 transgenen Ratten wurde außerdem die Rolle des transgen exprimierten humanen CD46 in dem Ratten-Modell für MV induzierte ZNS Erkrankungen untersucht.

2 Material

2.1 Geräte

Agarose-Gelelektrophoresekammer	Institutswerkstatt
Analysenwaage	Sartorius
Autoklav	MM, München
Binokular	Olympus
BioPhotometer	Eppendorf
Brutschränke	Heraeus
Durchflußzytometer (FACScan)	Becton-Dickinson
Fluoreszenzmikroskop mit Kamera	Leica
Glasplatten, Spacer, Kämme	BioRad, Institutswerkstatt
Halbtrockenblottingapparatur	Institutswerkstatt
Heizblock	Eppendorf
Kühl-/Gefrierschrank	Siemens
Mikropipetten	Eppendorf, Socorex
Mikroskope	Hund
Mikrowellengerät	Panasonic
Netzgeräte	Consort
PCR-Maschinen	Perkin Elmer, MJ Research
pH-Meter	WTW
Rotoren SS34, JA20, AH629	Sorvall, Beckmann
SDS-Gelelektrophoresekammer	Institutswerkstatt
Sterilwerkbank	Gelaire
Tiefkühltruhe (-80°C)	REVCO

Tischzentrifugen	Hettich, Heraeus, Millipore
Ultrazentrifugen	Sorvall, DuPont Industries
Vortexer	Bender & Hobein
Waage	Mettler
Wasserbad	Köttermann
Wippschüttler	Bühler
Zählkammer	Thoma
Zentrifugen	Hettich, Sorvall, Beckmann

2.2 Verbrauchsmaterialien

Steriles Einwegmaterial, z.B. für die Zellkultur (Gewebekulturflaschen, Platten oder Schalen) oder für die Molekularbiologie (Reaktionsgefäße unterschiedlicher Volumina) und für die allgemeine Laborarbeit, wurde von den Firmen Eppendorf, Greiner, Nunc und Sarstedt geliefert.

AGFA Pan APX 100 s/w Film	AGFA
Dialyseschlauch	Serva
Einmalhandschuhe	Roth, Braun
Einmalküvetten	Eppendorf
Kammerobjektträger	LabTek
Nitrozellulosemembran	Schleicher und Schuell
Parafilm	Roth
Pasteurpipetten	Nunc
Pipettenspitzen	Eppendorf, Roth
QIAshredder	Qiagen
Röntgenfilme	Kodak, AGFA
Spritzen	Primo
Sterilfilter	Millipore, Schleicher und Schuell

3MM-Whatmanpapier	BioRad
Zentrifugenröhrchen	Kontron

2.3 Chemikalien

Acrylamid 4K-Lösung (30%)	AppliChem
Agarose (ultra Pure, Elektrophorese Grad)	GibcoBRL (Best.-Nr.: 15510-027)
Ammoniumacetat	Merck
Ammoniumpersulfat	BioRad
Ammoniumsulfat	Merck
β -Mercaptoethanol	Sigma
BSA (Fraktion V)	ICN (Best.-Nr.: 160069)
Chloroform	AppliChem
1-Deoxymannojirimycin (DMJ)	Calbiochem
Dimethylsulfoxid	Roth
EDTA	Sigma
Eisessig	Baker
Ethanol absolut (unvergällt)	AppliChem
Ethidiumbromid	Sigma
Formaldehyd (37%)	Roth
Glycin	AppliChem
Größenstandards	
DNA-Marker	Merck
SDS-PAGE Protein Standard, vorgefärbt	GibcoBRL
HEPES	Sigma
Isoamylalkohol	AppliChem
Isopropylalkohol	AppliChem
Magnesiumchlorid	Sigma
Methanol	Merck
Mineralöl	ICN
Morpholinopropansulfonsäure	Sigma

Natriumacetat	Merck
Natriumchlorid	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (SDS)	Sigma (Best.-Nr.: L4509)
Natriumhydroxid	Merck
Neutralrot (pH 6,8-8,0)	Merck (Best.-Nr.: 1369)
Nucleotid-Mix (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)	MBI
oligo(dT) ₁₅ -Primer	Roche
Paraformaldehyd	Merck
Polyethylenglycol 6000	Merck
peqGOLD RNA Pure	pegLab
Protein G Sepharose	Pharmacia
Proteinase-Inhibitoren "complete"	Boehringer
Proteinbestimmungslösungen	Sigma
Salzsäure 32%	Baker
SDS-PAGE-Probenpuffer reduzierend 4 fach	Roth
Sucrose	Sigma
Sulfo-NHS-LC-Biotin	Pierce
TEMED	Sigma
Tris-Base	Roth
Triton X-100	Sigma
Tween 20	Sigma

2.4 Medien, Lösungen und Puffer

2.4.1 Zellkultur

Concanavalin A (ConA)	Sigma (Best.-Nr.: C0412)
FKS	Biochrom (Best.-Nr.: S0115)
HBSS ⁻ -Lösung	Biochrom

Mounting-Medium	Sigma (Best.-Nr.: 1000-4)
nicht essentielle Aminosäuren	Biochrom
Poly-L-Lysin	Sigma (Best.-Nr.: P8920)
Pyruvat	Biochrom
Agar (2%):	aus Medienküche, Zusammensetzung: 2g Bacto-Agar in 100ml a.dest (autoklavieren)
ATV-Lösung:	aus Medienküche, Zusammensetzung: 137mM NaCl (= 8g/l), 5mM KCl (= 0,4g/l), 5mM D(+)- Glucose (= 1g/l), 7mM NaHCO ₃ (= 0,58g/l), Trypsin (= 0,5g/l), Versene (= 0,2g/l)
Antibiotikamix:	aus Medienküche, Zusammensetzung: Penicillin/Streptomycin (je 1g/10ml)
doppel MEM:	aus Medienküche, Zusammensetzung: doppelte Menge an MEM Bestandteilen pro Liter
Einfriermedium:	FKS mit 10% DMSO
Elutionspuffer (Ak-Säule):	0,1M Glycin-HCl (pH 2,7)
FACS-Puffer:	0,4% BSA, 0,02% N ₃ in Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem PBS
L (+)-Glutamin:	aus Medienküche, Zusammensetzung: 5g/100ml a.dest (= 342mM)
Hybridom-Medium:	RPMI 1640 (10% FKS), 2,4ml/l Antibiotikamix, 20ml/l L-Glutamin (400mM), 10ml/l nicht essentielle Aminosäuren 100x, 10ml/l Pyruvat (100mM)
MEM:	aus Medienküche, Zusammensetzung: Minimal essential medium (nach Eagle und Levine 1967)
Natriumhydrogencarbonat (5,6%):	aus Medienküche, Zusammensetzung: 56g/l NaHCO ₃ in a.dest (= 666mM)
Neutralrotlösung:	16g/l in a.dest
Overlay-Agar:	25% MEM (5% FKS), 37,5% Agar (2%ig), 37, 5% doppel MEM
Paraformaldehyd:	3,7% Paraformaldehyd in Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -freiem PBS

PBS:	aus Medienküche, Zusammensetzung: 138mM NaCl (= 8g/l), 2,7mM KCl (= 0,2g/l), 6,5mM Na ₂ HPO ₄ (= 1,15g/l), 1,5mM KH ₂ PO ₄ (= 0,2g/l), 0,9mM CaCl ₂ (= 0,167g/l), 0,5mM MgCl ₂ , pH 7,4
PBS Ca ²⁺ /Mg ²⁺ -frei:	aus Medienküche, Zusammensetzung: PBS ohne Ca ²⁺ /Mg ²⁺
RPMI 4+:	RPMI 1640 (10% FKS), 0,1% Antibiotikamix, 0,7% L (+)-Glutamin, 1% Pyruvat, 1% nicht essentielle Aminosäuren
RPMI 1640:	aus Medienküche, Zusammensetzung: GibcoBRL (Best.-Nr.: 51800-043)
Waschpuffer (Ak-Säule):	20mM NaH ₂ PO ₄ , 20mM Na ₂ HPO ₄ (pH 7,4)

2.4.2 Molekularbiologie

Entwicklerlösung für Röntgenfilme:	Kodak
0,1M DTT:	GibcoBRL
Fixiererlösung für Röntgenfilme:	Kodak
5x First Strand buffer:	GibcoBRL
10x Taq-Puffer:	Eppendorf, MBI
DNA-Puffer:	50mM Tris-HCl (pH 8,0), 100mM EDTA, 100mM NaCl, 1% SDS
10x DNaseI-Puffer:	400mM Tris-HCl (pH 7,5), 100mM NaCl, 60mM MgCl ₂
10x MOPS-Puffer:	0,4M Morpholinopropansulfonsäure, 100mM NaOAc, 10mM EDTA (pH 8,0)
RNA-Gelpuffer:	10% 10x MOPS-Puffer, 17,5% Formaldehyd (37%), Ethidumbromid
RNA-Probenpuffer:	50% Formamid, 15% Formaldehyd (37%) in 10% 10x MOPS-Puffer, 10% 10x Farbpuffer
RNA-Gelelektrophoresepuffer:	1x MOPS-Puffer
TAE-Gelelektrophoresepuffer:	2M Tris-Base, 0,57% Eisessig, 0,6M EDTA

2.4.3 Proteinbiochemie

Blocking-Puffer:	TBST-Lösung, 5% Magermilchpulver
Zell-Lysepuffer:	10mM Tris-HCl (pH 7,4), 0,5% Triton X-100, 0,15M NaCl, 1mM EDTA, 1 Tablette Proteinaseinhibitor
SDS-Elektrophoresepuffer:	3,03% Tris, 14,4% Glycin, 1% SDS
TBS:	25mM Tris-HCl, 150mM NaCl (pH 7,4)
TBST:	TBS + 0,05% Tween 20
WB I-Puffer:	0,3M Tris-HCl (pH 10,4), 20% Methanol
WB II-Puffer:	0,025M Tris-HCl (pH 7,4), 20% Methanol
WB III-Puffer:	0,04M Aminocaprinsäure, 0,025M Tris-HCl (pH 9,4), 20% Methanol

2.5 Kits

ABI Sequencing-Kit	Perkin-Elmer (Best.-Nr.: 4303152)
ECL-Kit	Amersham (Best.-Nr.: RPN 2106)
GenElute Mammalian total RNA Kit	Sigma (Best.-Nr.: RTN-70)
Mycoplasmentest-Kit	Stratagene (Best.-Nr.: 302007)
Mycoplasmen-Kur	Boehringer (Best.-Nr.: 799050)
Ready-To-Go™ PCR Beads	Amersham (Best.-Nr.: 27-9555-01)
RNeasy Mini Kit	Qiagen (Best.-Nr.: 74104)
TRPO-562 (Proteinbestimmung)	Sigma (Best.-Nr.: B9643, C2284)

2.6 Enzyme

DNaseI (RNase-frei)	Roche (Best.-Nr.: 776785)
EndoglycosidaseH (rekombinant, von Strep. plicatus)	Sigma (Best.-Nr.: E8388)
Proteinase K	Sigma (Best.-Nr.: P6556)
SuperScriptII RNaseH Reverse Transkriptase	GibcoBRL (Best.-Nr.: 18064-022)
Taq DNA Polymerase	Eppendorf (Best.-Nr.: MT050199), MBI (Best.-Nr.: EP0282)

2.7 Oligonukleotide (Primer)

Die Primer für Sequenzierungen und DNA-Amplifizierungen wurden bei den Firmen Eurogentec und Sigma bestellt.

Primerbezeichnung	Sequenzen 5' → 3'	Spezifität
CDV P fw	ATGTTTATGATCACAGCGGT	universal für Morbilliviren
CDV P rev	ATTGGGTTGCACCACTTGTC	universal für Morbilliviren
forw LIF rat	TGCCCCACTGCTCATCTG	Ratte
rev LIF rat	GACACAGGGCACATCCACAT	Ratte
r GAPDH forw neu1	CCTTCATTGACCTCAACTACATGGT	Ratte
r GAPDH rev neu1	TCATTGTCATACCAGGAAATGAGCT	Ratte
r TNF alpha fw	GGAAGACAGAGAGGAAATGGG	Ratte
r TNF alpha rev	CCCTCCTTATCTCCCTCGTCT	Ratte
r IL12 fw	TGTTGTAGAGGTGGACTGGC	Ratte
r IL12 rev	CCTTCTTGTGGAGCAGCAGA	Ratte
r IL10 fw	CAGAGCTTCAGCATGCTTGGC	Ratte
r IL10 rev	CCCGTTAGCTAAGATCTCTGG	Ratte
r IL6 fw	CTTCACAGAGGATAACCACC	Ratte
r IL6 rev	GGCATAGCACACTAGGTTTGC	Ratte
r IL4 fw	CCATGCACCGAGATGTTGTACC	Ratte
r IL4 rev	GCAAGTATTTCCCTCGTAGGATGC	Ratte
r IL1a fw	TTCACCTTCAAGGAGAGCCG	Ratte
r IL1a rev	CCGGAATCTCCTTCAGCAAC	Ratte
r IFNalpha1 fw	CTGTCTAGGATGTGACCTGCC	Ratte
r IFNalpha1 rev	GCCAGTAGGGAGTCTTCCTGG	Ratte
r IFNbeta1 fw	GAGGCAGCTGAATGGAAGGC	Ratte
r IFNbeta1 rev	CGGACCACCATCCAGGCATA	Ratte
r IFNgamma fw	GAGGAACTGGCAAAGGACGG	Ratte
r IFNgamma rev	GGCACACTCTTACCCAGAA	Ratte
UP-H62	ATCCACAATGTCACCACAACG	MV-H
H26	ATGCCTGATGTCTGGGTGACA	MV-H
H30	GATAGGGAGTACGACTTCAG	MV-H
H31	TTGAAGTAGGTGTTATCAGAA	MV-H
H32	CACCATTGAAGGATAACAGGA	MV-H
H33	AGGTGGATGGTGTGATGTCAA	MV-H
H25	GAAGTATCGTAGGTTGCCA	MV-H
H24K	CCACTCGGGATTCTCGCAGAG	MV-H
H23K	GGATTTCTGATAACACCTA	MV-H
H20	CCTTGACCTGATGCTCGATTG	MV-H
H27	TGACATCATGTGATTGGTTC	MV-H
H1352	GTATAGGTCCATCCCTGAACC	MV-H
H1045	GCTTTACCTCTCATCTCACAG	MV-H
MCP3	GCTTGAATGTCTGCTACTGGATCG	Mensch CD46
MCP5	CAGTCATGCCTTTTCTTTTACCG	Mensch CD46

Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen im MV-H-Gen

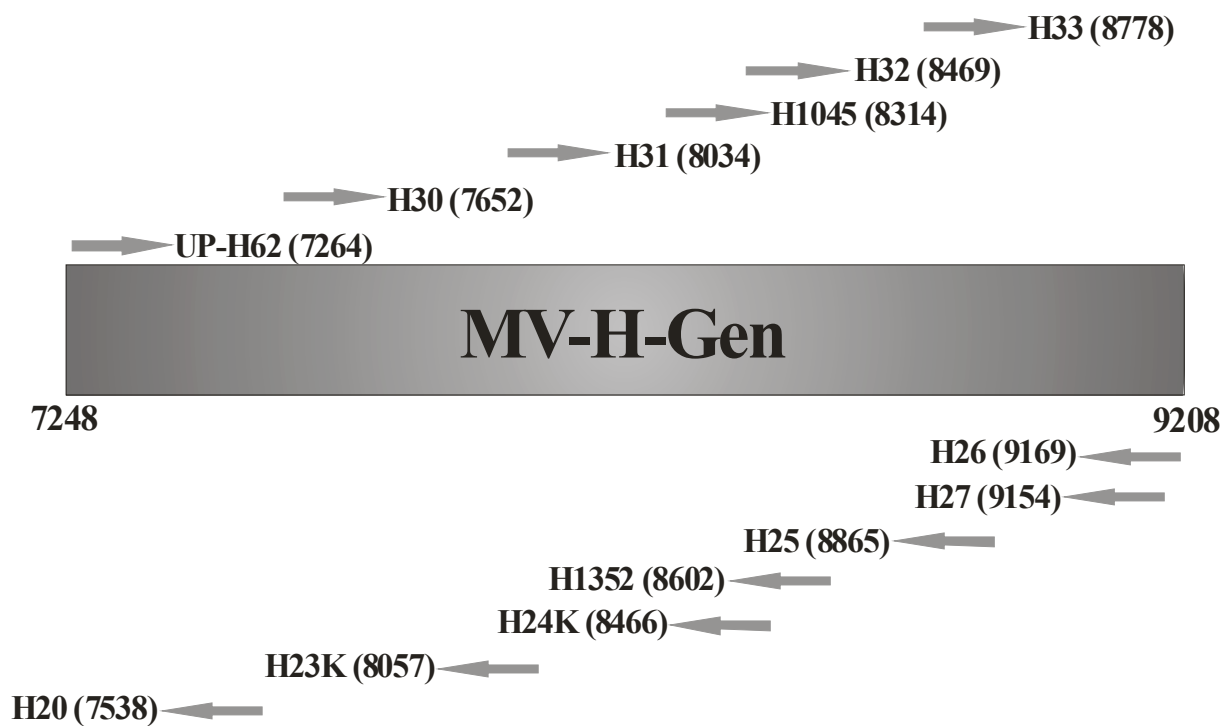


Abb. 2.1: Schematische Darstellung der Primerbindungsstellen im MV-H-Gen. Das H-Gen beginnt an Nukleotidposition 7248 und erstreckt sich bis einschließlich 9208. Der MV-H Proteintranslationsstart liegt bei Nukleotid 7271 und stoppt bei Nukleotid 9124. Die Zahl in Klammern gibt das Startnukleotid des jeweiligen Primers an.

2.8 Zellen

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

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft, Referenz
Vero	Nierenfibroblastenzelllinie	afrikanische Grüne Meerkatze (<i>Cercopithecus aethiops</i>); ATCC, Yasumura <i>et al.</i> , 1962
HeLa	Zervixkarzinoma-Epithelzelllinie	human; ATCC; Scherer <i>et al.</i> , 1953
B95a	semiadhärenter Subklon der EBV-transformierten B-Zelllinie B95	Krallenaffe (<i>Callithrix jacchus</i>); ATCC; Miller <i>et al.</i> , 1973
BJAB	lymphoblastoide B-Zelllinie	human; Menezes <i>et al.</i> , 1975
BJABpEdm	persistent mit Edm infizierte BJAB-Zelllinie	Institut für Virologie, Universität Würzburg, Schnorr <i>et al.</i> , 1997
BJABpWTF	persistent mit WTF infizierte BJAB-Zelllinie	Institut für Virologie, Universität Würzburg, Schnorr <i>et al.</i> , 1997
U251	Astrozytomzelllinie	human; Bigner <i>et al.</i> , 1981
NS20Y	Neuroblastom	murin, DSMZ; Amano <i>et al.</i> , 1972
DBT	Astrozytomzelllinie ("delayed brain tumor")	murin; Kumanashi T., 1967
IMR-32	Neuroblastom	human, ATCC; Tumilowicz <i>et al.</i> , 1970
SK-N-MC	Neuroblastom, neuroepithelial	human, ATCC; Biedler <i>et al.</i> , 1973
D54	Glioblastom	human, Bigner <i>et al.</i> , 1981
U373	Astrogliazelllinie	human, ATCC; Bigner <i>et al.</i> , 1981
C6	Gliomzelllinie	Ratte, ATCC; Benda <i>et al.</i> , 1968
PC-12	Neuronalzellen (Phäochromozytomzellen)	Ratte, ATCC; Greene <i>et al.</i> , 1976
HBMEC	Gehirndothelzelllinie	human, Greiffenberg <i>et al.</i> , 1998

Neben den in der Tabelle aufgeführten Zelllinien wurde mit primären Lewis-Ratten-Hirnzellen und Milzzellen von Lewis-Ratten und den CD46 transgenen Lewis-Ratten gearbeitet.

Außerdem wurden Hybridomzelllinien, die am Institut von S. Löffler hergestellt wurden, für die Antikörperproduktion (L77, Nc32, K29, K71) in Kultur gehalten.

2.9 Antikörper

2.9.1 Primärantikörper

Antikörper (Subtyp)	Spezifität	Herkunft/Typ	Hersteller
L77 (IgG2a)	MV-H (Epitop F)	M/m	AG JSS
K29 (IgG)	MV-H (Epitop C)	M/m	AG JSS
K71 (IgG2a)	MV-H (Epitop D)	M/m	AG JSS
Nc32 (IgG2a)	MV-H (Epitop D/E)	M/m	AG JSS
K83 (IgG2a)	MV-H (Epitop E)	M/m	AG JSS
F227 (IgG2a)	MV-N	M/m	AG JSS
A504 (IgG1)	MV-F	M/m	AG JSS
13/42 (IgG1)	CD46 (SCR1)	M/m	AG JSS
B97 (IgG1)	CD46 (SCR1)	M/m	AG JSS
10/88 (IgG1)	CD46 (SCR3+4)	M/m	AG JSS
H45	MV-H	R/p	AG SSS

M: Maus; R: Kaninchen; m: monoklonal; p: polyklonal

Alle verwendeten monoklonalen Antikörper gegen MV-Antigene und die verwendeten mAk gegen das CD46 wurden ursprünglich im Institut von Frau S. Löffler hergestellt.

2.9.2 Sekundärantikörper

Kaninchen anti-Maus (Fc), POX	Dianova (Best.-Nr.: 315-035-003)
Kaninchen anti-Maus (Fc), FITC	Dako (Best.-Nr.: F0261)
Kaninchen anti-Maus (Fc), PE	Dako (Best.-Nr.: R0439)
Schwein anti-Kaninchen (Fc), POX	Dako (Best.-Nr.: P0217)
Streptavidin-FITC	Dako (Best.-Nr.: F0422)

2.10 Virusstämme

Alle Virusstämme waren im Institut vorhanden. Die Rekombinanten Viren wurden von Iain Duffy und Paul Duprex aus der Arbeitsgruppe von Bert Rima, Queen's University Belfast, hergestellt.

Masern-Stamm	Typ
Edm	Vakzinellaborstamm
Edtag	molekularer Klon des Vakzinestammes Edm
CAM/RB	nagerhirnadaptierter neurovirulenter Stamm
CAM/Vero	an Vero Zellen adaptierter CAM-Stamm
EdtagCAMH	Rekombinantes Virus: Edtag mit dem Hämagglutinin-Gen des CAM-Stamms
EdtagCAMH-1/-15	Rekombinantes Virus: Edtag mit dem Hämagglutinin-Gen des CAM-Stamms und zusätzlich darin eingefügten Mutationen
Erlangen DEU/90	Wildtypisolat auf B-Zelllinie propagiert (Laborbezeichn. WTFb)
CAM/K29	CAM-Stamm, der in Gegenwart von dem anti-MV-H-Ak K29 gezüchtet wurde
CAM/K71	CAM-Stamm, der in Gegenwart von dem anti-MV-H-Ak K71 gezüchtet wurde
CAM/Nc32	CAM-Stamm, der in Gegenwart von dem anti-MV-H-Ak Nc32 gezüchtet wurde
CAM/L77	CAM-Stamm, der in Gegenwart von dem anti-MV-H-Ak 77 gezüchtet wurde

2.11 Versuchstiere

Trächtige Lewis-Ratten (Inzuchtstamm) wurden von Harlan Winkelmann (Borchem) bezogen. Lewis-Ratten zur Organentnahme entstammen der hauseigenen Zucht. Die ursprünglichen CD46 transgenen Ratten waren Sprague-Dawley-Ratten und wurden in der Publikation von Niewiesk *et al.* 1997 beschrieben. Diese Tiere wurden im hauseigenen Tierstall auf den genetischen Hintergrund von Lewis-Ratten zurückgekreuzt. Alle Tiere wurden unter spezifischen pathogen-freien Bedingungen bei einer Raumtemperatur von 22°C und einer Luftfeuchtigkeit von 50% gehalten.

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultur adhärenter Zellen

Die adhärenenten Zelllinien werden in Plastik-Gewebekulturflaschen in NaHCO₃-gepuffertem MEM, FKS (5% für Vero-Zellen, 10% für HeLa-Zellen, ebenso 10% für die Hirnzelllinien und die primären Ratten-Hirnzellen) und Antibiotika im Brutschrank bei 37°C und unter 5%iger CO₂-Begasung kultiviert. Nach Ausbildung konfluenter Zellrasen, werden die Zellen mit angewärmter ATV-Lösung abgelöst und im Verhältnis 1:10 in neue Flaschen ausgesät. Die B95a-Kultivierung verläuft ebenso, allerdings wird als Medium RPMI 1640 mit 10% FKS verwendet.

3.1.2 Kultur von Suspensionszellen

Die Suspensionszellen BJAB und die persistent infizierten BJAB-Zellen werden in Plastik-Gewebekulturflaschen verschiedener Größen im Brutschrank bei 37°C und unter 5%iger CO₂-Begasung in NaHCO₃-gepuffertem RPMI 1640, 10% FKS und Antibiotika kultiviert. Nachdem die Zellen dicht gewachsen sind, werden sie im Verhältnis 1:5 auf neue Kulturflaschen verteilt. Die frisch präparierten Ratten-Milzzellen werden ebenso kultiviert, allerdings wird RPMI 4+-Kulturmedium verwendet.

3.1.3 Kultur von Hybridomzellen zur Antikörpergewinnung

Hybridomzellen entstehen durch die Fusion von antikörperproduzierenden Milzzellen der Maus mit immortalisierten Maus-Myelomzellen SP2/0. Hybridomzellen heften sich zwar leicht an die Oberflächen der Kulturgefäße an, gehören aber nicht zu den richtig adhärenenten Zellen und lassen sich deshalb einfach durch Abspülen von den Gewebekulturflaschen ablösen. Es bedarf beim Splitten der Zellen keiner ATV-Lösung, ansonsten verläuft die

Kultur ähnlich der Kultur adhärenter Zellen. Die Hybridomzellen werden in Hybridom-Medium kultiviert. Für die Antikörperproduktion wachsen die Hybridomzellen als dichter Zellrasen und der Kulturüberstand wird beim Splitten der Zellen für die Antikörperaufreinigung entnommen.

3.1.4 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Für die Lagerung von Zellen über einen langen Zeitraum von wenigen Tagen bis einigen Jahren werden die Zellen in flüssigem Stickstoff aufbewahrt. Dazu werden 5×10^6 Zellen der Gewebekulturflasche entnommen, abzentrifugiert (10 Minuten, 4°C, 1200rpm) und das Zellpellet anschließend in kaltem Einfriermedium (FKS, 10% DMSO) resuspendiert. Das Einfrieren erfolgt schrittweise für zwei Stunden bei -20°C, über Nacht bei -80°C und dann erfolgt die Überführung zur Lagerung in flüssigem Stickstoff.

Um solche tiefgefrorenen Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wird die gefrorene Zellsuspension schnell in einem lauwarmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in einen zehnfachen Überschuss an entsprechendem Medium überführt, um das DMSO auszuverdünnen. Die Zellen werden dann pelletiert (10 Minuten, 4°C, 1200rpm) und in frischem Medium aufgenommen und in entsprechende Zellkulturflaschen ausgesät. Am folgenden Tag werden die Zellen noch einmal mit frischem Medium versorgt.

3.1.5 Mycoplasmentestung

Um eine Kontamination der Zellkulturen mit Mycoplasmen (zellwandlose, parasitäre Bakterien) zu vermeiden, wird regelmäßig auf Mycoplasmen getestet (hausintern als Serviceleistung). Hierzu werden die zu prüfenden Kulturen in Kulturmedium ohne Antibiotika überführt und drei Tage kultiviert. Zell-freier Überstand dient als Quelle für Mycoplasmen-DNA. Der Mycoplasmenachweis erfolgt mit einem Mycoplasmentest-Kit (mittels PCR) von Stratagene. Kontaminierte Kulturen werden entsorgt und neue, nicht kontaminierte Kulturen angelegt oder es wird, falls keine mycoplasmenfreien Zellen zur Verfügung stehen, eine Anti-Mycoplasmenkur durchgeführt. Bei der Eliminierung der Mycoplasmen wird eine Antibiotika-Kombination verwendet, um eine Resistenz-Entwicklung zu verhindern. Dem Kulturmedium wird BM-Cyclin1 (Pleuromutilin-Derivat mit einer Endkonzentration von 10µg/ml) für 3 Tage zugesetzt und nach Mediumwechsel wird BM-Cyclin2 (Tetracyclin-Derivat mit einer Endkonzentration von 5µg/ml) für 4 Tage zugesetzt. Dieser 7-tägige Zyklus wird dreimal wiederholt und im Anschluss an diese Mycoplasmenkur werden die Zellen noch einmal getestet.

3.1.6 Isolierung primärer Rattenhirnzellen

Für die Isolierung primärer Rattenhirnzellen werden neugeborene Lewis-Ratten aus der hauseigenen Tierzucht verwendet. Die Ratten werden durch Dekapitieren getötet und das Gehirn wird aus dem Schädel präpariert. Nachdem die Kopfhaut entfernt ist, kann man durch die noch sehr dünne Schädeldecke den Hemisphärenspalt erkennen, entlang dessen mit einer spitzen Schere vom Nacken her das Schädeldach geöffnet und das Gehirn herausgehoben wird. Die Gehirne werden in HBSS⁻-Lösung auf Eis überführt. Die Hirne werden zerteilt in Cerebellum und linke und rechte Hemisphäre, so lassen sich unter einem Binokular leichter die Meningen entfernen, wobei die Hirne stets mit HBSS⁻-Lösung bedeckt sind, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden und das Abziehen der Meningen zu erleichtern. Die so präparierten Gehirnteile werden in ein Metallsiebchen überführt, wie es auch für die Milzzell-Präparation benutzt wird. Mit einem sterilen Stempel einer 5ml Spritze wird das Gewebe durch die feinen Maschen des Siebes passiert und auf diese Art das Gewebe dissoziiert und die Zellen vereinzelt. Die Siebe werden mit HBSS⁻-Lösung nachgespült, um noch anhaftende Zellen abzuspielen. Im Anschluss an diese Vereinzelnung der Zellen folgen 3 Waschschrirte jeweils 10 Minuten, bei 1200rpm und 4°C mit HBSS⁻-Lösung. Diese Zellen werden dann entsprechend der weiteren Versuchsdurchführung entweder in Kammer-Objektträger ausgesät, die zuvor mit PLL beschichtet wurden, was sich aber als nicht unbedingt notwendig herausgestellt hat, oder in Gewebekulturflaschen.

3.1.7 Isolierung von Ratten-Milzzellen

Nachdem Lymphozyten in den primären lymphatischen Organen gebildet werden, wandern sie in die sekundären peripheren Organe aus, zu diesen auch die Milz gehört. Sie beherbergt T- und B-Zellen, sowie Makrophagen und spezialisierte Antigenpräsentierende Zellen. Diese Ratten-Milzzellen werden für Infektions- und Virusbindungsversuche sowohl von Lewis-Ratten als auch von CD46 transgenen Ratten, und für die DNA-Isolation benötigt. Die Ratten werden durch CO₂-Begasung getötet und die Milz durch einen seitlichen Bauchschnitt entnommen und in PBS mit 1% FKS überführt. Die Milzzellen werden dadurch vereinzelt, indem das Milzgewebe mit einem Stempel einer 5ml Spritze durch ein Metallsieb passiert wird. Das Sieb wird mit PBS mit 1% FKS gewaschen und die homogene Zellsuspension in ein 50ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellen werden dreimal mit PBS mit 1% FKS gewaschen, indem sie bei 1000rpm für 15 Minuten ohne Bremse bei 15°C zentrifugiert werden. Die Zellen werden dann in RPMI 4+-Medium aufgenommen und je nach weiterer

Versuchsdurchführung z.B. für nachfolgende Infektions- oder Virusbindungsstudien mit Concanavalin A (Con A; 5µg/ml) stimuliert.

3.1.8 Tierversuche

Um die Neurovirulenz der verschiedenen MV-Stämme im Lewis-Ratten-Tiermodell zu untersuchen, werden neugeborenen Lewis-Ratten (1 bis 2 Tage alt) 20µl einer Virussuspension intracerebral (i.c.) in die linke Hirnhälfte injiziert, wobei der Titer bei $1 - 5 \times 10^4$ Viren im Injektionsvolumen liegt. Die Tiere werden in den folgenden Tagen gewogen und ihr körperlicher Zustand beurteilt. Am Tag 3, 5, 7 und 14 nach Infektion werden jeweils zwei Tiere getötet und deren Gehirne entnommen eines wird für weitere Untersuchungen bei -80°C eingefroren und das andere wird für die Immunhistologie in 4% Paraformaldehyd-Lösung überführt. Haben sich 14 Tagen nach der Infektion noch keine Krankheitsanzeichen eingestellt (z.B. bei Kontrolltieren oder mit nicht neurovirulenten Viren Infizierte) so werden die Tiere getötet.

3.1.9 Rückkreuzung der CD46 transgenen Ratten auf den genetischen Lewis-Hintergrund

Um Untersuchungen bezüglich eines möglichen Zusammenhanges zwischen der Neurovirulenz und der Rezeptorbenutzung (CD46 als ein MV-Rezeptor) durchzuführen, werden Experimente mit CD46 transgenen Ratten gemacht. Die ursprünglichen transgenen Ratten sind Spraque-Dawley-Ratten, da aber bekannt ist, dass MV ein unterschiedliches Infektionsverhalten, je nach genetischem Hintergrund der Tiere, zeigen, werden die transgenen Spraque-Dawley-Ratten auf den genetischen Hintergrund von Lewis-Ratten zurückgekreuzt, die als Modell für MV induzierte ZNS-Erkrankungen dienen. Die ursprünglichen transgenen Spraque-Dawley-Ratten werden sechsmal mit Lewis-Ratten gekreuzt und anschließend nur noch die transgenen Ratten unter sich. Zur Überprüfung, ob die Nachkommenratten noch das Transgen tragen, wird eine PCR-Analyse mit CD46 spezifischen Primern durchgeführt. Die Template DNA wird aus einem kleinen Gewebestück des Ohres gewonnen. Zur Rückkreuzung werden dann nur die CD46 positiven Ratten verwendet.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Viruspräparation auf adhärennten Zellen

Zur Herstellung von Virusvorräten der verschiedenen MV-Stämme (außer WTFb und CAM/RB) werden Vero-Zellen in 650ml Gewebekulturflaschen verwendet. Ein zu 80% konfluenten Zell-Monolayer wird mit dem entsprechenden MV-Stamm mit einer MOI = 0,01 in 10ml Serum-freiem Medium infiziert. Nach einer Inkubation von 60 Min. im Brutschrank wird das Medium entfernt und die Zellen mit 20ml frischem Medium mit 5% FKS versorgt. Bis zur maximalen Synzytienbildung (CPE) nach ca. 3 dpi werden die Zellen bei 37°C im Brutschrank kultiviert. Zur Isolation der Viren wird das Medium soweit entfernt, dass der Boden der verwendeten Kulturflasche gerade noch mit Medium bedeckt ist (ca. 5ml), und die Flasche wird über Nacht bei -80°C eingefroren. Am nächsten Tag werden die Zellen langsam bei 4°C aufgetaut und das zellgebundene Virus durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren oder mit Hilfe eines Zellschabers freigesetzt. Zelldebris wird durch Zentrifugation für 15 Min. bei 3000rpm entfernt und der Überstand als Virusvorrat aliquotiert und bei -80°C gelagert. Für die Produktion von Virusvorrat mit hohem Virustiter wird der Virusvorrat nach Pelletierung des Zelldebris in sterile Dialyseschläuche gefüllt und bei 4°C auf PEG gelegt, bis sich das Volumen der Viruslösung in den Schläuchen um ca. 70% reduziert hat. Der so konzentrierte Virusvorrat wird nochmals für 5 Min. bei 500rpm zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen und anschließend für die Lagerung bei -80°C aliquotiert. Die Viruskonzentration der Virusvorräte wird durch Plaquetests bestimmt.

Als Kontrollpräparation, die als Negativ-Kontrolle für die Versuchsdurchführungen erforderlich ist, werden nicht-infizierte Vero-Zellen parallel angesetzt und auf die selbe Art und Weise wie die infizierten Zellen behandelt.

3.2.2 Viruspräparation mit Suspensionszellen

Zur Herstellung von Virusvorräten des MV-Stammes WTFb werden 1×10^8 BJAB-Zellen abzentrifugiert und in geringem Volumen (ca. 5ml) mit einer MOI von 0,01 für 60 Min. bei 37°C infiziert. Anschließend wird mit Medium das Volumen der Zellsuspension vergrößert und die Zellen bis zum Erreichen des maximalen CPE (4-5 dpi) inkubiert. Mit diesen infizierten BJAB-Zellen werden erneut Zellen einer frischen BJAB-Kultur in Roller-Bottles, die einen Tag zuvor 1:2 passagiert worden sind, infiziert, und erneut bis zum Erreichen des maximalen CPEs bei 37°C kultiviert. Während der Inkubation wird die Kulturflasche

maschinell gerollt. Zur Ernte des Virus werden die Zellen vom Kulturmedium abzentrifugiert, um das Volumen zu verringern, und so den Titer (infektiöse Partikel pro Volumeneinheit) zu erhöhen. Die infizierten Zellen werden in 10ml kaltem, FKS-freiem RPMI-Medium resuspendiert und zur Freisetzung des zellgebundenen Virus werden die Zellen über Nacht bei -80°C eingefroren, am nächsten Tag langsam bei 4°C aufgetaut und anschließend auf- und abpipettiert. Nach Pelletierung des Zelldebris bei 3000rpm für 15 Min. und 4°C wird der Überstand als Virusvorrat aliquotiert und bei -80°C gelagert. Die Konzentration infektiöser Viren in der Präparation wird durch Endpunkttitration bestimmt.

Als Kontrollpräparation werden nicht-infizierte BJAB-Zellen parallel zur WTFb-Virusinfektion angesetzt.

3.2.3 Viruspräparation des MV-Stamms CAM/RB

Der MV-Stamm CAM/RB wird durch Passage in Rattenhirnen vermehrt. Dazu werden neugeborenen Lewis-Ratten $20\mu\text{l}$ CAM/RB (ca. 1×10^4 pfu) in die linke Hemisphäre injiziert, und bis zum Auftreten deutlicher Krankheitsanzeichen (Gewichtsverlust, Ataxien), was ca. 4 Tage dauert, gewartet. Dann werden die Tiere durch Dekapitieren getötet und das Gehirn wird aus dem Schädel präpariert. Das Gehirn wird anschließend mit dem Stempel einer 5ml Spritze durch ein steriles Metallsieb, wie es auch für die Milzzellpräparation verwendet wird, passiert. Es wird mit wenig sterilem PBS nachgespült und dieses Hirnhomogenat aliquotiert und bei -80°C gelagert.

3.2.4 Titerbestimmung der Viruspräparationen mittels Endpunkttitration

Die Viruskonzentration des MV-Stammes WTFb wird auf B95a-Zellen bestimmt, obwohl das Virus auf BJAB-Zellen kultiviert wird. Der Vorteil der B95a-Zellen besteht in ihrer Adhärenz, man kann Anhand der Synzytienbildung gut den Infektionsverlauf im Lichtmikroskop verfolgen, wohingegen, die Infektion der BJAB-Zellen durch die Durchflußzytometrie bestimmt werden müsste. In parallelen Experimenten auf beiden Zelltypen konnte kein Unterschied der Titrationsergebnisse festgestellt werden.

Für eine Endpunkttitration wird ein zu 50% konfluenten B95a-Zell-Monolayer mit 1:4 angesetzten Verdünnungsreihen des Virus in Medium mit 5% FKS überschichtet und anschließend fünf Tage bei 37°C inkubiert. Es wird der letzte Napf ausgewertet, in dem das Virus noch zu einer deutlichen Infektion führt. Aus jeweils 3 Ansätzen wird der Mittelwert bestimmt.

3.2.5 Titerbestimmung mittels Plaquetest

Der Plaquetest ist eine Methode, um die präzise Menge an infektiösen Viruspartikeln in einer Viruspräparation zu bestimmen. Plaques sind Infektionsfoci, die durch einen zytopathischen Effekt (CPE) in einem konfluenten Zellrasen entstehen. Jeder Plaque stammt von einem infektiösen Virus ab und kann somit zur genauen Berechnung des Titers ausgezählt werden.

Zur Bestimmung der MV-Titer der Viruspräparationen werden Virusverdünnungsreihen in Zehnerschritten in FKS-freiem Medium bei 4°C hergestellt. Je 1ml jeder Verdünnung wird dann auf einen fast konfluenten Vero-Zellrasen in einer 6-Clusterplatte (ca. 1×10^6 Zellen/Napf) gegeben und die Platte für 60 Min. bei 37°C inkubiert. Danach wird das virushaltige Medium abgezogen, zweimal mit Serum-freiem Medium gewaschen und vorsichtig mit 40°C temperiertem Overlay-Agar überschichtet. Nach dem Erstarren des Agars bei RT werden die Zellen bis zum Auftreten deutlicher Plaques (5-6 dpi) bei 37°C inkubiert und anschließend in der Vitalfärbung mit 1ml Neutralrotlösung (1:200 in PBS verdünnt) für 1 Std. gefärbt. Nach Abziehen der Färbelösung werden die Zellen für weitere 10-15 Std. inkubiert, bevor die entstandenen Plaques auf der Lichtplatte ausgezählt werden können. Pro Viruspräparation werden 3 unabhängige Platten ausgezählt und der Mittelwert als Titer angenommen.

3.2.6 Plaquereinigung

Um die Anreicherung von defekten Viruspartikeln zu minimieren, wird bei den Viren, die auf adhären Zellen gezogen werden, für den Grundvorrat (Master-Stock) eine Plaquereinigung (= Klonierung) durchgeführt. Die zu reinigende Viruspräparation wird in 1:10er Verdünnungsreihen in einer 6-Clusterplatte mit zu 80% konfluenten Vero-Zellen ausgesät. Nach einer Stunde Infektion bei 37°C wird das Medium abgezogen und der Zellrasen mit Overlay-Agar überschichtet. Die Zellen werden bis zum Erscheinen von Plaques bei 37°C inkubiert. Große Einzelplaques werden mit einer Pasteurpipette vorsichtig ausgestochen und in kleine Zellkulturflaschen mit zu 80% konfluenten Vero-Zellen überführt. Aus den infizierten Kulturen werden wiederum Viren präpariert. Für die Herstellung eines Grundvorrates wird die Plaquereinigung dreimal wiederholt.

3.2.7 Ultrazentrifugation von Virus-Präparationen zur Einengung

Für die Produktion von MV-Vorräten mit hohem Virustiter werden Vero-Zellen nach der in 3.2.1 beschriebenen Methode infiziert. Nach der Ausbildung des maximalen CPEs werden die infizierten Zellen in geringem Volumen über Nacht bei -80°C eingefroren, und anschließend bei 4°C langsam aufgetaut. Zur Freisetzung des zellgebundenen Virus wird das aufgetaute Virus-Zellmaterial in einen Zellhomogenisator auf Eis überführt und so das Virus durch die Scherkräfte freigesetzt. Zelldebris wird durch Zentrifugation bei 4000rpm für 15 Min. und 4°C pelletiert und der Virusüberstand wird in Ultrazentrifugenröhrchen auf 25%ige Sucrosekissen geschichtet. Die Viren werden dann durch die Ultrazentrifugation bei 26000rpm für 90 Min. bei 4°C pelletiert und können in entsprechendem Volumen PBS resuspendiert werden.

Auch bei dieser Methode wird eine Kontrollpräparation mit uninfizierten Vero-Zellen hergestellt.

3.2.8 Virusbindungs-Assay

Adhärente Zellen werden mit ATV-Lösung abgelöst und anschließend einmal mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Suspensionszellen werden ebenfalls einmal mit PBS ohne $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ gewaschen. Je 5×10^4 Zellen in $100\mu\text{l}$ PBS werden bei 37°C für eine Stunde mit einer bestimmten MOI oder einer bekannten Proteinkonzentration (durch Bestimmung in der Western-Blot-Analyse) in FACS-Röhrchen inkubiert. Anschließend werden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen und mit einem mAk gegen das MV-H-Protein, sowie den respektiven FITC-konjugierten Sekundäntikörpern gefärbt und anschließend mit 3,7% PFA fixiert (Lebendfärbung). Die Menge an gebundenem Virus an den Zellen wird in einem Durchflußzytometer (FACScan, Beckton Dickinson) bestimmt. Es wird der Quotient aus der medianen Fluoreszenzintensität der mit Virus inkubierten Ansätze und der medianen Fluoreszenzintensität der Ansätze ohne Virus gebildet und dieser gibt die relative Virusbindung an.

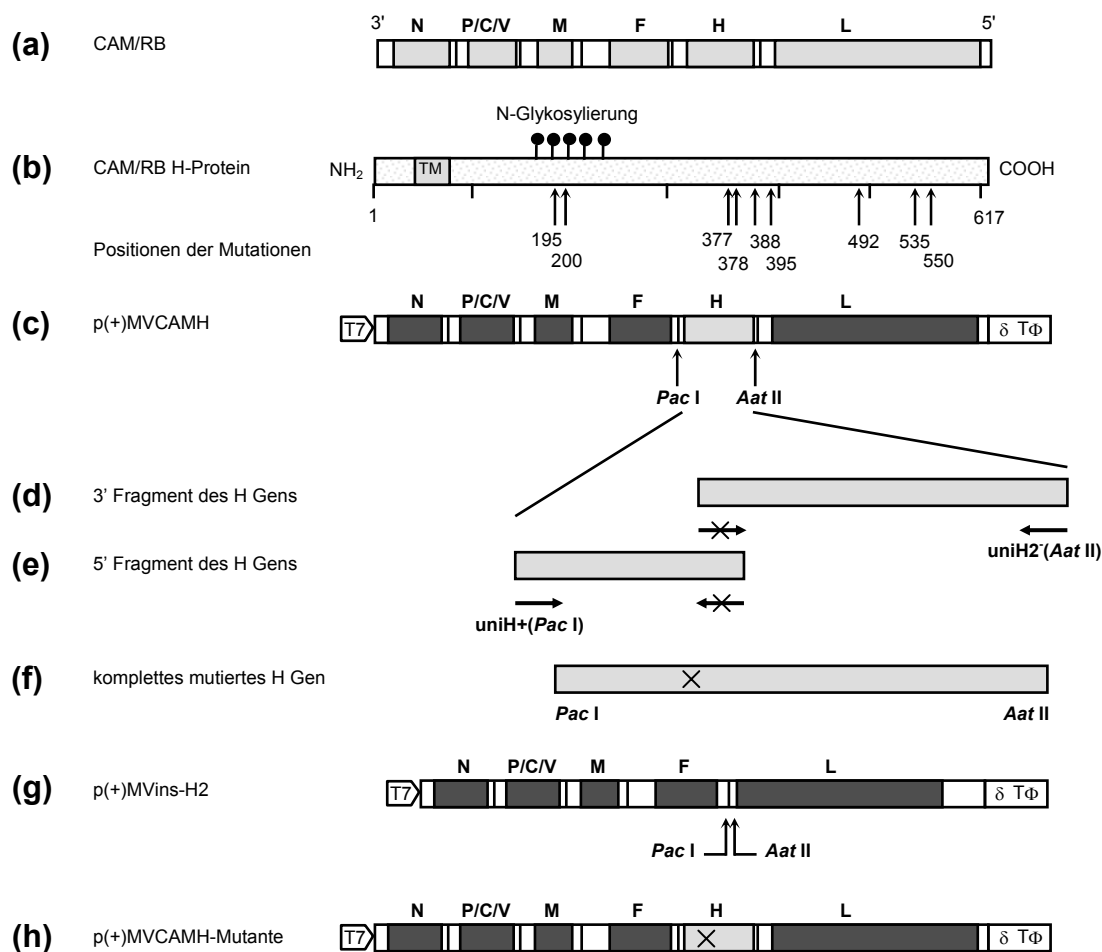
3.2.9 Infektions-Assay

Die zu testenden Zellen werden mit einer bestimmten Virusmenge für eine Stunde bei 37°C in möglichst geringem Volumen infiziert. Nach dieser Zeit werden die Zellen gewaschen und für 3 Tage weiterkultiviert. Zur Infektionskontrolle wird eine Immunfluoreszenzfärbung

durchgeführt, wobei die Menge an exprimiertem MV-H-Protein an der Zelloberfläche detektiert wird.

3.2.10 Herstellung rekombinanter Viren

Die rekombinanten Masernviren wurden von Iain Duffy und Paul Duprex aus der Arbeitsgruppe von Bert Rima in Belfast, Queen's University, hergestellt. Die Methode wird in der Veröffentlichung von Moeller *et al.* (2001) beschrieben. Im Folgenden ist noch einmal das Klonierungsschema gezeigt:



Für die Konstruktion der kompletten rekombinanten Virus cDNA mit Mutationen im H-Gen wird der H-Gen Insertionsvektor p(+)/MVins-H2 benutzt (g). Dieser enthält die zwei Schnittstellen *Pac I* und *Aat II*, die es erlauben das mutierte CAM/RB H-Gen (d,e,f) einzufügen, welches durch überlappende PCR (f) aus den beiden Teilfragmenten, die durch die Primerpaare uniH+/überlappendender Primer 3'(e) und überlappendender Primer 5'/uniH- (d), synthetisiert wurden. Die überlappenden Primer tragen die jeweiligen Punktmutationen.

3.3 Histochemische Methoden

3.3.1 Immunfluoreszenzfärbung für die Durchflußzytometrie

Immunfluoreszenzfärbungen werden in einem Becton-Dickenson FACScan™ unter Verwendung der Lysis II™-Software aufgenommen und mittels der CellQuest-Software™ ausgewertet.

Falls nicht anders angegeben werden ca. 5×10^4 Zellen pro FACS-Röhrchen eingesetzt. Alle Zentrifugationsschritte erfolgen in einer vorgekühlten Hettich-Zentrifuge bei 1200rpm für 10 Min. Primärantikörper (anti-MV-H- und anti-MV-F-Ak) und FITC- bzw. RPE-markierte Zweitantikörper werden, falls nicht anders vermerkt, 1:100 verdünnt und in einem Volumen von 100µl für 45 Min. bei 4°C mit den Zellen inkubiert.

Bei den Lebendfärbungen gegen Oberflächen-Antigene werden die Zellen ohne Fixierung mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert und anschließend einmal mit 2ml FACS-Puffer gewaschen. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper werden die Zellen erneut gewaschen und anschließend für 10 Min. mit 3,7% PFA (in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS) fixiert. Nach einem abschließenden Waschschrift, werden die Zellen in 500µl FACS-Puffer resuspendiert und können in der Durchflußzytometrie analysiert werden.

Bei einer Doppelfärbung, was in diesem Fall die Detektion zweier Oberflächenantigene bedeutete, sind 4 Antikörperinkubationsschritte notwendig. Die MV-H Färbung erfolgt mit einem entsprechenden primären anti-MV-H-Antikörper (L77, Nc32, K29, K71, K83) und mit einem anti-Maus RPE konjugierten Sekundärantikörper. Das MV-F-Protein wird mit einem biotinylierten anti-MV-F-Ak gekoppelt und mit Streptavidin-FITC detektiert.

Zur Kontrolle der Hintergrundfärbung und Kompensation der Doppelfärbungen werden entsprechende Isotypantikörperfärbungen und Positivkontrollen eingesetzt.

Immunfluoreszenzfärbungen gegen intrazelluläre Antigene werden mit Zellen durchgeführt, die nach einem Waschschrift mit 2ml FACS-Puffer zunächst für 10 Min. bei 4°C mit 100µl 3,7% PFA, 0,25% Triton X-100 (in $\text{Ca}^{2+}/\text{Mg}^{2+}$ -freiem PBS) fixiert und permeabilisiert wurden. Zur Blockierung unspezifischer Bindungsstellen, die durch die Fixierung/Permeabilisierung generiert werden, werden die Zellen für 30 Min. mit 2ml RPMI (10% FKS) inkubiert. Anschließend erfolgt die Färbung wie oben beschrieben mit Primär- und Sekundärantikörpern.

Für die quantitative Analyse wird ein "Fluorescence activated cell scanner" (FACS) mit Argon-Laser (488nm) und angeschlossenem Hewlett-Packard Computer mit LysisII-Software verwendet. In diesem Gerät ist es mit Hilfe von Laserlicht möglich, Zellen anhand morphologischer Kriterien wie Größe (im "forward scatter" = FSC) und Granularität (im "side-scatter" = SSC) sowie exprimierter Antigene (nach Anfärbung mit Fluoreszenzfarbstoffen) zu unterscheiden und mit Hilfe der Computer-Software zu analysieren.

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbung für die Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie werden Objektträger mit acht aufgesetzten Kammern verwendet (Chamber-Slides). Die Antikörper-Inkubationen finden in Gesamtvolumina von 100µl in den einzelnen Kammern statt. Die Waschschritte der Immunfluoreszenzfärbung werden mit eiskalten Lösungen (PBS) unter leichtem Schütteln in den Kammern durchgeführt.

Die Zellen werden zuerst für 7 Min. mit 3,7% Paraformaldehyd bei 4°C fixiert, um ein Ablösen der Zellen bei den Waschschritten zu verhindern (bei den primären Hirnzellen ist dies der kritische Punkt). Im Anschluss wird das Paraformaldehyd gewaschen und die generierten unspezifischen Bindungsstellen mit 10% FKS-haltigen Medium blockiert (30 Min., 4°C). Zur Färbung der Oberflächenantigenen werden dann die Zellen mit dem jeweiligen Primärantikörper für 45 Min. auf Eis inkubiert und nach zwei Waschschritten mit PBS anschließend für 45 Min. mit dem entsprechenden Sekundärantikörper. Bei Doppelfärbungen mit verschiedenen Primär- und Sekundärantikörpern erfolgen die beiden Färbungen nacheinander. Die Antikörper werden dabei in der Regel 1:100 verdünnt eingesetzt. Nach dem letzten Waschschritt der Färbung wird die Flüssigkeit gut abgezogen, der Kammeraufsatz entfernt (nach Anleitung des Herstellers) und der Objektträger mit einem Tropfen Mounting Medium überschichtet und ein Deckglas aufgelegt.

Sollen auch intrazelluläre Antigene gefärbt werden, werden die Zellen nach einem Waschschritt mit PBS zunächst für ca. 7 Min. bei 4°C mit 100µl 3,7% PFA fixiert, einmal gewaschen und dann zur Permeabilisierung 10 Min. mit 100µl 0,25% Triton X-100 (in PBS) inkubiert. In verschiedenen Versuchen zeigte sich, dass so die Ablösung von Zellen geringer ausfiel als bei gleichzeitiger Fixierung und Permeabilisierung. Anschließend werden die Zellen gewaschen und für 30 Min. und 4°C mit Medium mit 10% FKS inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen, die durch die Fixierung generiert werden, zu blockieren. Die restliche Färbung erfolgt dann nach dem oben beschriebenen Schema.

Die Auswertung erfolgt an einem Fluoreszenz-Mikroskop der Fa. Leitz mit eingebauter Fotoeinheit. Für Fluoreszenz-Aufnahmen wird manuell eine Belichtungszeit von 20 Sek. für 400 ASA-Filme eingestellt.

3.3.3 Immunfluoreszenzfärbung für die Histologie

Die Histologie der Ratten-Hirne wird in Zusammenarbeit mit Professor Meyermann in Tübingen durchgeführt. Die entnommenen Rattenhirne werden in eine 4%ige Paraformaldehyd-Lösung gegeben, darin fixiert und nach Tübingen geschickt. Dort werden Hirnschnitte angefertigt und diese werden mit dem anti-MV-N-Antikörper (F227) gefärbt.

3.4 Proteinanalyse

3.4.1 Bestimmung von Proteinkonzentrationen

Für die Bestimmung von Proteinkonzentrationen wird das Sigma-Kit TRPO-562 benutzt. Dieses System nutzt die Reduktion von zweiwertigem Kupfer zu einwertigem Kupfer durch Proteine, die durch das Vorhandensein von Bicinchoninsäure in der Reaktionslösung zu violetten Komplexen reagieren, deren maximale Absorption bei 562nm liegt. Die Absorption ist dabei direkt proportional zur Proteinkonzentration. Für diesen Test werden 10µl der zu bestimmenden Proteinlösung mit 2ml einer 1:50 Verdünnung von Kupfer (II)-Sulfat in Bicinchoninsäure versetzt und für 30 Min. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Nach kurzem Abkühlen des Reaktionsansatzes wird die Adsorption bei 562nm vermessen und der Proteingehalt der Probe mit Hilfe einer Standardproteinlösung mit bekanntem Proteingehalt berechnet.

Außerdem konnte mit dem BioPhotometer der Firma Eppendorf der Proteingehalt einer Probe auch direkt vermessen werden, nachdem man die entsprechenden Parameter in das Gerät eingegeben hatte.

3.4.2 Herstellung von Zelllysaten

Zelllysate werden hergestellt, um Proteine für eine SDS-Gel-Elektrophorese mit anschließender Western-Blot-Analyse zur Detektion von CD46 oder zum Nachweis der viralen Hüllproteine aus infizierten Vero-Zellen zu gewinnen. Die Zellen werden pelletiert, der Überstand abgesaugt und in 100µl Zell-Lysepuffer aufgelöst. Es folgt eine 30 Min.

Inkubation bei RT, und ab und zu wird gevortext. Anschließend werden die Zellkerne bei 10000rpm für 10 Min. abzentrifugiert. Der proteinhaltige Überstand wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und eine Proteinbestimmung durchgeführt und die Proben werden bei -20°C gelagert.

3.4.3 Herstellung von Gewebelysaten

Gewebelysate von verschiedenen Organen der transgenen und normalen Lewis-Ratten wurden hergestellt, um die Anwesenheit und die Größe des Membran Cofaktor Proteins (CD46) durch die Western-Blot-Analyse zu überprüfen. Die Ratten werden durch CO₂-Begasung getötet und folgende Gewebe entnommen: Lunge, Herz, Niere, Milz, Darm, Haut, Muskel, Hirn und Leber. Die einzelnen Gewebe werden jeweils möglichst gut zerkleinert und eine Gewebemenge von einem Volumen von ca. 100µl zur Gewinnung der Proteine eingesetzt und mit 500µl des Zell-Lysepuffers versetzt, die weiteren Schritte entsprechen der Proteinisolation aus Zellen, wie bei der Herstellung von Zellysaten beschrieben (siehe 3.4.2).

3.4.4 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen nach ihrem Molekulargewicht wird nach der Methode von Laemmli (1970) durchgeführt.

Durch das denaturierende Agens SDS werden Proteine in eine linearisierte Form aufgefaltet und mit einer Hülle aus negativ geladenen SDS-Molekülen zylindrisch umgeben. Dadurch erhalten die Moleküle entsprechend ihrer Größe eine negative Ladung und können in einem elektrischen Feld innerhalb einer Gelmatrix aufgetrennt werden. Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems erlaubt die Aufkonzentration verschiedener Proben an der Grenze zwischen dem so genannten Sammelgel und dem folgenden Trenngel. Das im Sammelgel und im Probenpuffer enthaltene Glycin liegt aufgrund des pH-Wertes im Sammelgel als Zwitterion vor. Somit werden die Proteine zwischen den so genannten Leitonen (= Chloridionen) und den Folgeionen (= Glycinionen) gefangen und unter dem Einfluss des elektrischen Feldes fokussiert. Bei Erreichen des Trenngels kommt es zu einem pH-Sprung von pH 6,8 auf pH 8,7. Das Glycin liegt dann als Anion vor und wandert als kleines Molekül zusammen mit den Chloridionen den größeren Proteinanionen voraus. Die Proteinanionen sind nun nicht mehr zwischen den ehemaligen Leit- und Folgeionen gefangen und werden in dem Trenngel unter dem Einfluss des angelegten elektrischen Feldes innerhalb der Gelmatrix nur entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Die Proteine aus Zell- oder Gewebelysaten für den CD46 Nachweis oder aus Viruspräparationen zur Untersuchung der

Größe des H-Proteins werden in einem diskontinuierlichen 10%igen Polyacrylamidgel elektrophoretisch aufgetrennt. Für die verwendete Gel-Apparatur werden nachfolgende Lösungen benötigt:

Trenngel:

- 6,6ml 30%ige Acrylamidlösung
- 7,5ml 1M Tris-HCl, pH 8,8
- 5,6ml a.dest
- 0,2ml 10% SDS
- 0,2ml 20% APS
- 50µl TEMED

Die Trenngel-Lösung wird blasenfrei bis etwa 4 Zentimeter unter die Oberkanten der Glasplatten eingefüllt und vorsichtig mit 2ml a.dest überschichtet. Nach Polymerisation des Gels wird das Wasser entfernt und das Sammelgel mit folgender Zusammensetzung auf das Trenngel gegossen:

Sammelgel:

- 1,25ml 30%ige Acrylamid-Lösung
- 1,25ml 1M Tris-HCl, pH 6,8
- 7,4ml a.dest
- 100µl 10% SDS
- 50µl 20% APS
- 20µl TEMED

In das noch flüssige Sammelgel wird ein Kamm eingeschoben, der nach Polymerisation, Einsetzen der Gelapparatur in die Elektrophoresekammer und Einfüllen des Proteingepuffers wieder entfernt wird. Die somit entstandenen Taschen werden vor Beladung mit den Proteinproben mit Puffer ausgespült. Die Proben werden mit reduzierendem Probenpuffer versetzt, bei 95°C für 5 Min. denaturiert und pro Spur gleiche Proteinmengen aufgetragen. Die Elektrophorese pro Gel erfolgte bei 40 mA. Bei einer Elektrophorese über Nacht werden 8 mA angelegt.

Im Anschluss an die Elektrophorese wird das Gel für die Western-Blot-Analyse weiterverwendet.

3.4.5 Western-Blot-Analyse

Der Western-Blot nach Towbin *et al.* (1979) ist allgemein eine Methode um einzelne Proteine mit spezifischen Antikörpern aus einem Proteingemisch nachzuweisen. Hierzu werden die durch die SDS-Gelelektrophorese aufgetrennten Proteine auf eine Nitrocellulosemembran

übertragen, wobei das Proteinmuster und die Immunaktivität der Proteine erhalten bleiben. Deshalb bezeichnet man dieses Verfahren auch als Immuno-Blotting. Die Übertragung der Proteine erfolgt mit einer semitrockenen „Blottingapparatur“ nach Anlegen eines Stromflusses zwischen Anode und Kathode.

Der Aufbau der Transfereinheit sieht wie folgt aus:

Kathode (oben)

vier 3MM-Papiere, getränkt mit WBIII

Polyacridamidgel, äquilibriert in WBIII

Nitrocellulosemembran, äquilibriert in WBII

zwei 3MM-Papiere, getränkt mit WBII

drei 3MM-Papiere, getränkt mit WBI

Anode (unten)

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

Nach Beendigung des Proteintransfers werden unspezifische Proteinbindungsstellen auf der Nitrocellulosemembran mit Blockingpuffer bei 4°C ü/N blockiert. Alle weiteren Inkubations- und Waschschriffe erfolgen auf einem Wippschüttler bei RT. Der Immunonachweis der MV-H-Proteine oder des CD46 auf der Nitrozellulosemembran erfolgt mittels der spezifischen Antikörper (MV-H-Proteine: polykl. Kaninchenserum; CD46: 13/42-Ak). Die Ak-Verdünnungen (1:100) werden in Blockingpuffer angesetzt. Nach 2 Stunden Inkubation wird die Membran dreimal 10 Min. mit TBST gewaschen. Der Primärantikörper-Nachweis erfolgt durch eine Inkubation der Membran mit einem Peroxidase-gekoppelten Zweitantikörper für 45 Min. (anti-Kaninchen-POX (1:2000) für MV-H; anti-Maus-POX (1:1000) für CD46). Nach erneuten Waschschriffen, dreimal mit TBST und einmal mit TBS, werden mittels des ECL™-Systems von Amersham die Proteine nachgewiesen. Die Meerrettichperoxidase setzt dabei ein Substrat um, wobei ein Röntgenfilm an der Stelle der spezifisch markierten Proteinbanden über die dabei erfolgende Freisetzung von Photonen geschwärzt wird.

3.4.6 Reinigung von monoklonalen Antikörpern

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

3.4.7 Biotinylierung von monoklonalen Antikörpern

Für die Durchflußzytometrie war es notwendig den monoklonalen Maus Antikörper A504, der gegen das MV-Fusions-Protein gerichtet ist, mit Biotin zu koppeln, damit er mit FITC konjugiertem Streptavidin nachgewiesen werden kann. Zur Biotinylierung des Antikörpers wird Sulfo-NHS-LC-Biotin mit einem 20-fach molaren Überschuss zum Protein gegeben (Ak-Konzentration 2mg/ml + 200µg Biotin) für 2 Stunden auf Eis unter gelegentlichem Schütteln inkubiert. Um ungebundenes Biotin aus der Antikörper-Lösung zu entfernen wird anschließend für 24 Stunden gegen PBS dialysiert.

3.4.8 Glykosylierungsinhibition der MV-H-Proteine während der Viruszucht

Im Western-Blot weisen Glykoproteine ein typisches diffuses Laufverhalten auf, was durch ihre Zuckerreste bedingt ist. Für die Untersuchung von Proteingrößenunterschieden, die aufgrund des Fehlens von Glykosylierungsstellen auftreten können, ist es notwendig, möglichst klare Banden zu erhalten. Deshalb wird eine Glykosylierungsinhibition an einer definierten Stelle während der Prozessierung durchgeführt. Diese Behandlung führt zu weniger diffusen Banden.

Um die Glykosylierung des MV-H-Proteins während der Synthese der Proteine im rauen Endoplasmatischen Retikulum (ER) und Golgi-Apparat der infizierten Vero-Zellen zu unterbinden, wird das Zellkulturmedium nach einer 6 stündigen Infektion gewechselt und das

frische Medium mit 1mM der Substanz 1-Deoxymannojirimycin (DMJ) versetzt. DMJ ist ein spezieller α -MannosidaseI Inhibitor der im Golgi-Apparat die MannosidaseI blockiert und den Umbau von Zuckern des "high"-Mannose-Typs zu komplexen Oligosacchariden unterbindet. Die Zellen werden in Gegenwart des DMJ bis zum Auftreten von deutlichen CPEs kultiviert und anschließend wird eine Viruspräparation durchgeführt.

3.4.9 EndoglycosidaseH-Verdau von Virus

Diese Enzymbehandlung wird durchgeführt, um die Größe der MV-H-Proteine im Western-Blot besser vergleichen zu können. Die EndoglycosidaseH ist ein Enzym, das Mannosen von einem Glykoprotein abspaltet. Das Enzym kann für die selektive Abspaltung von Oligomannosen verwendet werden, da es an N-Acetylglucosaminketten spaltet, und nur Oligomannosen aber keine komplexen Glykane angreift. Für den EndoH-Verdau werden 50 μ l einer Virusproduktion (jeweils mit und ohne Vorbehandlung mit DMJ) mit 20 μ l Enzym versetzt und für 2 Std. bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Diese behandelten Viren werden dann in der Western-Blot-Analyse untersucht.

3.5 Molekularbiologische Methoden

3.5.1 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

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

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

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

Der Grad der Verunreinigung durch Proteine kann durch Messung der Extinktion bei 280 nm festgestellt werden. Das Verhältnis $\text{OD}_{260}/\text{OD}_{280}$ gibt den Reinheitsgrad der Nukleinsäure wieder. Saubere RNA-Präparationen besitzen einen Quotienten von 2,0, saubere DNA-Präparationen von 1,8. Für die Messungen werden 5 μ l der Nukleinsäurelösung mit a.dest auf 500 μ l aufgefüllt und in Quarzglas Küvetten vermessen.

Mit dem BioPhotometer der Firma Eppendorf können Messungen der Nukleinsäurekonzentration in Plasikküvetten durchgeführt werden, und nach Eingabe entsprechender Parameter kann der Reinheitsgrad direkt abgelesen werden.

3.5.2 DNA und RNA Gelelektrophorese

Die Agarose-Gel-Elektrophorese nach Sambrook *et al.* (1989) ist eine Methode zur Trennung geladener Moleküle in einem elektrischen Feld aufgrund ihrer Größe und der damit verbundenen unterschiedlichen Laufgeschwindigkeit im Gel. In der elektrischen neutralen Gelmatrix (Agarose) wandern kleine Fragmente schneller und damit weiter als größere Fragmente. Dabei hat die Konformation der Nukleinsäure, die durch das Zucker-Phosphat-Gerüst negativ geladen ist, einen bedeutenden Einfluss auf die Wanderungsgeschwindigkeit. Agarosegele werden zur Kontrolle von DNA- und RNA-Präparationen und zur Dokumentation von PCR-Amplifikationen und PCR-Produkten angefertigt. Dazu wird für den Nachweis von DNA Agarose in einer Konzentration von 1% in 1x TAE-Puffer in der Mikrowelle für 2 Min. gekocht. Nach Abkühlung auf ca. 50°C und Zugabe einer Ethidiumbromidlösung zu einer Endkonzentration von 1µg/ml wird die Agarose-Lösung in einen Gelträger gegossen und ein entsprechender Kamm zur Erzeugung der Auftragstaschen eingesetzt. Nach Polymerisation des Agarosegels wird der Gelträger in die Elektrophoreseapparatur mit Elektrophorese-Puffer (1x TAE) eingesetzt und der Kamm aus dem Gel gezogen. Das Gel wird mit den DNA-Proben, die zuvor mit 1/10 Vol. Farbpuffer versehen wurden, beladen. Nach dem Elektrophoreselauf bei 1,2 V/cm², werden die entsprechend ihrer Größe aufgetrennten DNA-Moleküle im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert.

Zum Nachweis von RNA wird die Agarose in einer Konzentration von 1% in a.dest aufgekocht, auf ca. 50°C abkühlen lassen, und dann werden die übrigen Lösungen des RNA-Gelpuffer zugegeben. Die weitere Vorgehensweise gleicht der DNA-Gelelektrophorese, jedoch dient als Elektrophoresepuffer 1x MOPS-Puffer. Intakte RNA-Präparationen eukaryontischer Zellen zeichnen sich durch zwei Banden aus, die durch die Hauptfraktionen der RNA - 18S-rRNA und 28S-rRNA - gebildet werden.

3.5.3 DNA-Präparation aus Zellen oder Geweben

Zum Nachweis des CD46 der transgenen Ratten werden DNA-Präparationen aus einem kleinen Ohrgewebestückchen isoliert und diese DNA in der anschließenden PCR eingesetzt. Für die Isolation der DNA werden ca. 4mm² Ohr (oder alternativ 25mg Gewebe oder 2,5 x

10⁶ Zellen) eingesetzt. Es werden 700µl der DNA-Isolationslösung und 35µl Proteinase K (10mg/ml) hinzugefügt und bei 56°C ü/N (oder 3-4 Std bei Zellen) inkubiert und ab und zu kräftig geschüttelt. Im Anschluss an die Inkubation wird kräftig für ca. 5 Min. geschüttelt (es sollten keine sichtbaren Gewebestücke mehr vorhanden sein). Es werden 250µl gesättigte NaCl-Lösung zugesetzt und erneut 5 Min. geschüttelt, dann 10 Min. bei 13000rpm zentrifugiert und 750µl des Überstandes (ohne die Oberphase) in ein neues Reaktionsgefäß überführt. Zur DNA-Präzipitation werden 500µl Isopropanol hinzugegeben und 2 Min. gemischt und im Anschluss 10 Min. bei 13000rpm zentrifugiert. Der Überstand wird dekantiert und das DNA Pellet zweimal mit kaltem 70% Ethanol für 10 Min. bei 13000rpm zentrifugiert und auf diese Art gewaschen. Die DNA wird in einem geeigneten Puffer resuspendiert und bis zur weiteren Verwendung auf -20°C gelagert.

3.5.4 RNA-Präparationen

3.5.4.1 RNA-Präparation aus Rattenhirnen für die Zytokinanalyse

Gesamt-RNA aus den tiefgefrorenen Rattenhirnen der Tierversuche wird mit der Isolationslösung peqGOLD RNAPure™ der Firma pegLab - als optimierte Guanidinisothiocyant/Phenol-Methode für die Extraktion von RNA - isoliert. Die Gehirne werden gewogen und pro verwendeten 100mg Gehirnmateriale wird 1ml der Lösung verwendet. Die Hirne werden jeweils mit der entsprechenden Menge an Isolations-Lösung versetzt und in einem Homogenisator gründlich zerkleinert, so dass keine Gewebestücke mehr sichtbar sind. Die Proben werden 5 Min. bei RT inkubiert und danach mit 0,2ml Chloroform pro ml eingesetzter Lösung sehr gut gemischt. Nach einer erneuten Inkubation von 10 Min. bei RT werden die Proben 5 Min. bei 12000g RT zentrifugiert. Dadurch entsteht eine Trennung der wässrigen und der Phenol/Chloroform-Phase. Die obere RNA-haltige Phase wird in ein neues Reaktionsgefäß überführt und mit 0,5ml Isopropanol pro eingesetztem ml der Isolationslösung vermischt und 15 Min. bei RT zur Präzipitation der RNA stehen gelassen. Zur Pelletierung der RNA wird 10 Min. bei 12000g und 4°C zentrifugiert. Das Pellet wird anschließend zweimal mit kaltem 75% Ethanol jeweils für 10 Min. bei 12000g und 4°C gewaschen. Das Pellet wird danach an der Luft getrocknet und in RNase-freiem Wasser resuspendiert.

3.5.4.2 RNA-Präparation aus Viruspräparationen für die Sequenzierung

Für die Sequenzierung der MV-H-Gene werden zu 80% konfluente Vero-Zellen in mittleren Flaschen mit den entsprechenden Viren infiziert und nach Ausbildung eines deutlichen CPEs, wird eine Isolation der Gesamt-RNA der Zellen gemacht, somit auch der Virus RNA. Für die Isolation von Gesamt-RNA aus Zellen werden das Qiagen RNeasy Mini-Kit und das GenElute Mammalian total RNA-Kit verwendet, welche sauberere und schneller präparierte RNA liefern als die Präparation über einen CsCl-Gradienten und das Risiko einer Degradation der RNA deutlich vermindern. Die Präparation der RNA erfolgt entsprechend der Angaben der Hersteller (die Puffer-Nomenklatur entspricht den Angaben der Hersteller).

Qiagen-Kit:

Pelletierte Zellen (bis zu 5×10^6 Zellen) werden in Eppendorf-Gefäßen durch die Zugabe von 350µl des Guanidinisothiocyanat und β -Mercaptoethanol enthaltenden RLT-Puffers lysiert. Verbliebene Zellklumpen werden durch kurzes vortexen aufgelöst. Das Lysat wird auf eine QIAshredder-Spin-Säule in einem 2ml Reaktionsgefäß aufgetragen und durch 2 Min. Zentrifugation bei 13000rpm homogenisiert. Zum Homogenisat werden dann 350µl 70% EtOH gegeben und durch pipettieren gemischt. Die Probe wird dann auf eine RNeasy-Mini-Spin-Säule in einem 2ml Reaktionsgefäß aufgetragen, für 15 Sek. bei 11000rpm zentrifugiert und der Durchfluss verworfen. Die Spin-Säule wird einmal mit 700µl RW1-Puffer gewaschen, die Säule in ein neues Reaktionsgefäß gegeben und mit 500µl RPE-Puffer gewaschen (15 Sek. bei 11000rpm). Es wird nochmals mit 500µl RPE-Puffer gewaschen und die Säule zur Trocknung der RNeasy-Membran 2 Min. bei 12000rpm zentrifugiert. Zur Elution der RNA werden dann 50µl RNase-freies Wasser direkt auf die Membran der Säule gegeben und 1 Min. bei 11000rpm in ein neues Reaktionsgefäß eluiert. Die isolierte RNA wird dann im Agarose-Gel kontrolliert und gegebenenfalls noch mit dem Photometer vermessen.

Sigma-Kit:

Pelletierte Zellen (bis zu 3×10^6 Zellen) werden in einem Reaktionsgefäß durch die Zugabe von 300µl Lysis-Puffer mit β -Mercaptoethanol lysiert. Das Lysat wird auf eine Filtrationssäule zur Abtrennung der Proteine gegeben und 2 Min. bei 13000rpm RT zentrifugiert. Dem Lysat wird das gleiche Volumen 70% Ethanol zugesetzt und gut gemischt. Die Lysat/Ethanol-Mischung wird anschließend auf eine Bindungs-Säule gegeben und 15

Sek. bei 13000rpm zentrifugiert. Die an die Membran gebundene RNA wird dann mit 500µl Waschlösung1 15 Sek. gewaschen und die Säule auf ein neues Reaktionsgefäß gegeben. Es folgt ein zweiter Waschschriff mit 500µl Waschlösung2, dieser wird wiederholt. Die Filtrate werden jeweils verworfen. Im Anschluss an die Waschschriffe wird für 2 Min. bei 13000rpm zentrifugiert, um das Ethanol von der Membran zu entfernen. Die Säule wird wieder auf ein neues Reaktionsgefäß gesetzt und die Elution der RNA erfolgt mit 50µl der Elutionslösung 1 Min. bei 13000rpm. Die isolierte RNA wird dann im Agarose-Gel kontrolliert und gegebenenfalls noch mit dem Photometer vermessen.

3.5.5 DNaseI-Verdau isolierter RNA aus Gehirnen

Bei der Isolierung von Gesamt-RNA nach der in 3.5.4.1 beschriebenen Methode, befinden sich noch Verunreinigungen von DNA in den Proben, so dass in der sich anschließenden PCR keine eindeutigen Ergebnisse erzielt werden. Deshalb werden die RNA-Proben einem DNaseI-Verdau (DNaseI, RNase-frei, von Roche) unterzogen. Dazu werden 20µl RNA-Lösung mit 2µl DNase-Puffer und 1µl Enzym vermischt und 60 Min. bei 37°C inkubiert. Die DNase wird anschließend bei 70°C für 15 Min. inaktiviert.

3.5.6 Reverse Transkription

Mit Hilfe der Reversen Transkription wird Virus RNA bzw. genomische RNA in cDNA umgeschrieben, um diese in der PCR als Template einzusetzen. Unter Verwendung von oligo(dT)₁₅-Primern, die sich an das polyadenylierte Ende der mRNAs anlagern, und RNaseH Reverser Transkriptase (SuperSkript-II™ von GibcoBRL) wird die RNA in cDNA umgeschrieben.

Der Reaktionsansatz setzt sich aus folgenden Komponenten zusammen:

1ng – 5µg totaler RNA

1µl oligo(dT)₁₅-Primer

1µl dNTP-Mix,

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

4µl 5x RT-Puffer

2µl 0,1M Dithiothreitol (DTT)

zugefügt, gemischt, kurz zentrifugiert und für 2 Min. bei 42°C temperiert. Zu diesem Reaktionsansatz wird dann 1µl der Reversen Transkriptase zugefügt, erneut gemischt und für

50 Min. bei 42°C inkubiert. Das Enzym wird dann durch Erhitzen auf 70°C für 15 Min. inaktiviert.

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

3.5.7 Polymerase-Ketten-Reaktion

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

Der allgemeine Zyklus sieht wie folgt aus:

Vorabdenaturierung	95°C	2 min	1 x
Denaturierung	95°C	1 min	
Annealing	x°C	1 min	30 Zyklen
Extension	72°C	y min	
Endextension	72°C	7 min	1x

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

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

Der Reaktionsansatz für eine PCR setzt sich wie folgt zusammen:

100ng – 1µg DNA

5µl 10x Taq-Puffer

5µl dNTP-Mix

2,5µl 25mM MgCl₂

50pM "upper primer"

50pM "lower primer"

0,5µl Taq-Polymerase

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

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

Es werden folgende Programme zur Amplifizierung benutzt:

- Amplifizierung des gesamten MV-H-Gens:

Annealingtemperatur 58°C, Extensionszeit 2 min, 30 Zyklen

- Virus- und Zytokinnachweis in den Rattenhirnen:

Annealingtemperatur 58°C, Extensionszeit 1,5 min, 30 Zyklen, außer mit den Primern:

Morbillivirus universal Primer (CDV P): Annealingtemperatur 51°C, Extensionszeit 1 min, 30 Zyklen

LIF: Annealingtemperatur 61°C, Extensionszeit 1 min, 30 Zyklen

- Amplifizierung des CD46-Gens aus Geweben oder Zellen:

Annealingtemperatur 65°C, Extensionszeit 2 min, 35 Zyklen

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

3.5.8 Sequenzierung

Zur Sequenzierung der MV-H-Gene wird die Methode der Taq Cycle Sequenzierung mit Dye-Deoxy Terminatoren benutzt.

Dieser nicht-radioaktiven Sequenziermethode liegt das von Sanger *et al.* (1977) entwickelte Prinzip des Kettenabbruchs zugrunde. Hierbei dient einzelsträngige Plasmid DNA als Template für die DNA-Polymerase, wobei in einer *in vitro* Polymerisationsreaktion die Synthese des komplementären Stranges vom 5'-Ende in Richtung 3'-Ende katalysiert wird. Bei der in dieser Arbeit verwendeten Methode werden verschiedenfarbig fluoreszenzmarkierte Didesoxynukleosidtriphosphate (ddNTP) zum Reaktionsansatz gegeben, bei dessen Einbau es zum Kettenabbruch kommt. Die Sequenz-Reaktion wird im Rahmen einer PCR durchgeführt, bei der in einem Ansatz Template-DNA, DNA-Polymerase, ein Primer und die markierten ddNTPs gemischt werden. Die PCR-Reaktion setzt sich aus den sich wiederholenden Zyklen Denaturierung, Annealing und Extension zusammen. Es entsteht durch den Kettenabbruch bei dem Einbau von ddNTPs eine Fragmentpopulation, die nach Aufreinigung in speziellen Kapillaren aufgetrennt werden kann. Durch Laser-Detektion der verschiedenfarbig fluoreszierenden ddNTPs und Digitalisierung der Daten kann die Abfolge der Basen bestimmt werden. Die Durchführung erfolgt an einem Applied Biosystem Sequenzierautomat. Die Bedienung des Sequenzierers erfolgt als Serviceleistung des Hauses und wird von der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Siddell durchgeführt.

Bestandteile eines Reaktionsansatzes:

200ng Template-DNA

70ng Primer

3µl Sequenzier-Mix (Bestandteile laut Hersteller)

Ansatz mit sterilem a.dest auf ein Volumen von 10µl auffüllen.

Das Sequenzier-Programm lautet:

Denaturierung:	96°C	30 sec	
Annealing:	50°C	15 sec	25 Zyklen
Extension:	60°C	4 min	

Wird für die Sequenzierung als Templat-DNA ein PCR-Produkt verwendet, so ist es nötig, diese DNA vor der Sequenzier-PCR aufzureinigen, um im Ansatz befindliche Primer zu entfernen. Dazu wird das PCR-Produkt mit 1 Vol Ammoniumacetat (4M) und 6 Volumen absolutem Ethanol gemischt, und 30 Min. bei RT, 13000rpm zentrifugiert. Das Pellet wird danach zweimal mit 70% Ethanol gewaschen (je 10 Min. bei 13000rpm und RT), das Pellet kurz getrocknet und in entsprechendem Volumen a.dest resuspendiert.

Die Aufreinigung der Sequenzierproben nach der Sequenzier-PCR verläuft in folgenden Schritten. Zu dem PCR-Ansatz werden 1/10 Volumen 3M Natriumacetat (pH 5,2) und 2,5 Volumen absolutes Ethanol gegeben, gemischt und 20 Min. bei 13000rpm zentrifugiert, das Pellet wird zweimal mit 70% Ethanol gewaschen (je 10 Min. 13000rpm), danach wird das Pellet leicht getrocknet und in 15µl Sequenzier-Ladepuffer (TSR, laut Angaben des Herstellers) resuspendiert. Der Ansatz wird anschließend für 2 Min. auf 95°C erhitzt und nach dem schnellen Abkühlen auf Eis in ein Gefäß mit speziellem Deckel überführt und bei 4°C bis zur Sequenzierung aufbewahrt.

4 Ergebnisse

4.1 Charakterisierung der molekularen Grundlagen der Neurovirulenz

Die im Folgenden beschriebenen Ergebnisse gliedern sich nach der chronologischen Abfolge der Versuchsdurchführungen und den entsprechenden Überlegungen dazu.

4.1.1 Grundlagen

Die Grundlage für die Untersuchung der Neurovirulenz von MV bildete die Veröffentlichung von Liebert *et al.* (1994). Mutationen im Hämagglutinin (H)-Gen, die durch die gleichzeitige Inkubation der Viren während der Passagierung mit neutralisierenden monoklonalen Antikörpern gegen das Hämagglutinin hervorgerufen wurden, führten zu einem unterschiedlichen Neurovirulenzverhalten. In der Tabelle 4.1 sind die untersuchten Viren mit den entsprechenden Mutationen im Vergleich zum original CAM-Stamm dargestellt:

Tab. 4.1: Vergleich der Sequenzen zwischen dem CAM-Stamm und den natürlichen monoklonalen Antikörperscape-Mutanten CAM/L77, CAM/Nc32, CAM/K29 und CAM/K71. Die beiden Mutanten CAM/K83 und CAM/K17 wurden bezüglich ihrer Sequenz nicht definiert. Daten nach Liebert *et al.*, 1994.

Virus Bezeichnung	Sequenzänderung in den mutierten Viren		Neurovirulenz der Mutante
	Nukleotide	Aminosäuren	
CAM/L77	603, 619 1150, 1153	195 Gly → Arg, 200 Ser → Asn 377 Arg → Gln, 378 Met → Lys	ja
CAM/Nc32	603, 619 1182	195 Gly → Arg, 200 Ser → Asn 388 Gly → Ser	ja
CAM/K29	603, 619	195 Gly → Arg, 200 Ser → Asn	nein
CAM/K71	603, 619 1203	195 Gly → Arg, 200 Ser → Asn 395 Glu → Lys	nein
CAM/K83	ND	ND	ja
CAM/K17	ND	ND	schwach

Die beiden Viren CAM/K83 und CAM/K17 wurden in dieser Arbeit nicht weiter untersucht. Aufgrund dieser Erkenntnisse, dass auf Grund von Mutationen, die im H-Gen in der Anwesenheit von einem Selektionsdruck entstanden waren, ein veränderter Pathogenitätsmechanismus herbeigeführt wurde, wurden rekombinante Viren mit verschiedenen Einzel- und Doppelmutationen konstruiert, die in dieser Arbeit charakterisiert wurden.

4.1.2 Etablierung des Testsystems zur Identifizierung von Antikörperescape-Mutanten

Zur Untersuchung, ob ein Antikörper noch an das H-Protein binden kann, sollte ein einfaches Testsystem benutzt werden. Um zu untersuchen ob die FACS-Methode geeignet ist, wurde mit Hilfe der natürlichen Escape-Mutanten ein Testsystem entwickelt. Wobei in Doppelfärbungen das MV-H-Protein mit verschiedenen Antikörpern L77, K29 K71 und Nc32 und das MV-F-Protein als Kontroll-Molekül zur Standardisierung gefärbt wurde.

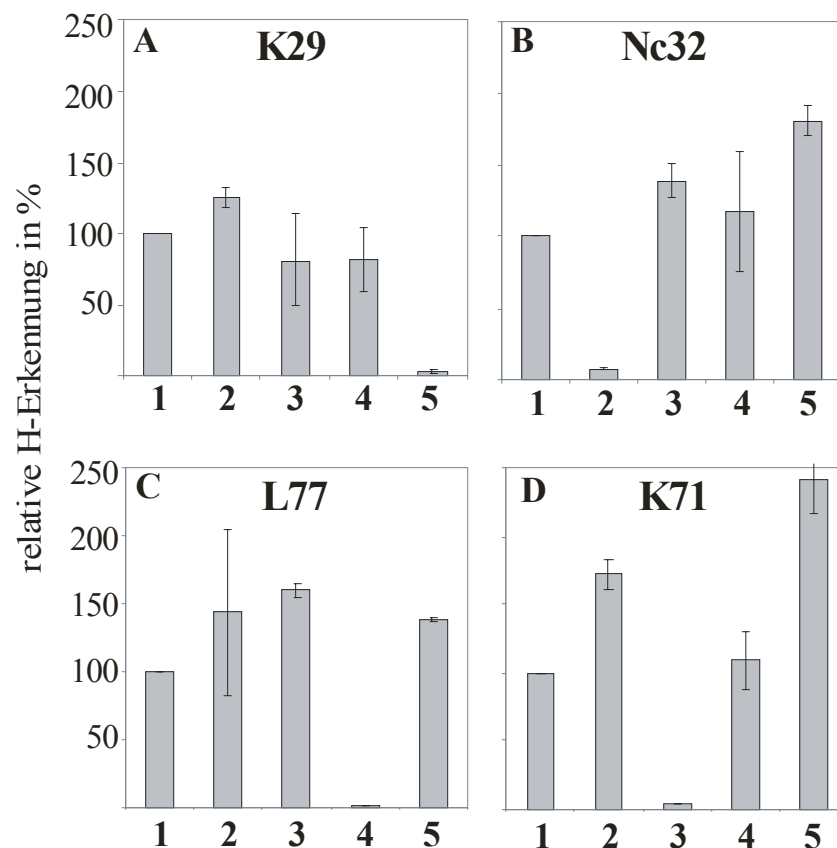


Abb. 4.1: FACS Analyse der natürlichen Escape-Mutanten. Die relative Expression der H-Proteine auf der Oberfläche von BJAB-Zellen, die mit CAM/RB (1) und den natürlichen escape Varianten CAM/Nc32 (2), CAM/K71 (3), CAM/L77 (4) und CAM/K29 (5) infiziert waren, wurde bestimmt durch Doppelfärbung und FACS Auswertung. Die relativen Signale sind hier nach der Färbung der Zellen mit den mAk K29 (A), Nc32 (B), L77 (C) und K71 (D) gezeigt. Die Signale die durch die Färbung mit einem anti-MV-F-Ak A504 erreicht wurden, galten als Standard für die Glykoproteinexpression. Die mAk erkennen die mit ihren respektiven escape Varianten infizierten Zellen nicht.

Mit Hilfe der Doppelfärbung und der FACS-Analyse ist es somit möglich den Antikörperescape deutlich zu machen. Es stand also für die weitere Arbeit ein Testsystem zur Überprüfung der rekombinanten Viren auf ihre Antikörperbindfähigkeit zur Verfügung.

4.1.3 Übersicht der rekombinanten Viren

In der Tabelle 4.2 sind die rekombinanten Viren dargestellt, die auf der Basis der Nukleotidaustausche der natürlichen Antikörperescape-Mutanten konstruiert wurden, mit deren Hilfe Aussagen über Antikörperescape, Neurovirulenz und ein Zusammenhang zwischen Neurovirulenz und dem Antikörperescape untersucht werden sollte. Edtag ist der molekulare Klon des Vakzinestammes Edm, und dient als Grundgerüst. In das H-Gen des CAM-Stammes wurden die Mutationen eingeführt, die von den natürlichen Escape-Mutanten bekannt waren. Da die Mutationen an den Stellen 603 und 619 bei allen natürlichen Mutanten vorkommen, wurden Rekombinante konstruiert, die entweder diese beiden Mutationen zusätzlich zu den anderen tragen, oder nur die Mutationen, die für jede Antikörpermutante gesondert gefunden wurden.

Tab. 4.2: Aufgeführt sind die verschiedenen rekombinanten Viren mit ihren jeweiligen Veränderungen im H-Gen, die aufgrund der Daten aus der Veröffentlichung von Liebert *et al.*, 1994 konstruiert wurden.

Virus	voraussichtl. Antikörperescape	Nukleotid Position 603 619	weitere Nukleotid-austausche	zu erwartende Neurovirulenz (nach Liebert <i>et al.</i> , 1994)
Edtag	keiner	A A		nein
EdtagCAMH	keiner	G G		ja
EdtagCAMHmt1	L77	G G	1150 G → A	ja
EdtagCAMHmt2	L77	G G	1153 T → A	ja
EdtagCAMHmt3	L77	G G	1150 G → A 1153 T → A	ja
EdtagCAMHmt4	Nc32	G G	1182 G → A	ja
EdtagCAMHmt5	K71	G G	1203 G → A	nein
EdtagCAMHmt6	K29	A A	keine	nein
EdtagCAMHmt7	L77	A A	1150 G → A	ja
EdtagCAMHmt8	L77	A A	1153 T → A	ja
EdtagCAMHmt9	L77	A A	1150 G → A 1153 T → A	ja
EdtagCAMHmt10	Nc32	A A	1182 G → A	ja
EdtagCAMHmt11	K71	A A	1203 G → A	nein

4.1.4 Charakterisierung der rekombinanten Viren bezüglich Antikörperescape

Bei den rekombinanten Viren wurde getestet, ob durch die jeweilig eingefügte Mutation, die Bindung der Antikörper an das H-Protein unterbunden wird oder nicht. Dazu wurde das in 4.1.2 beschriebene Testsystem benutzt, das die genaue Quantifizierung der Antikörpererkennung der H-Proteine zulässt.

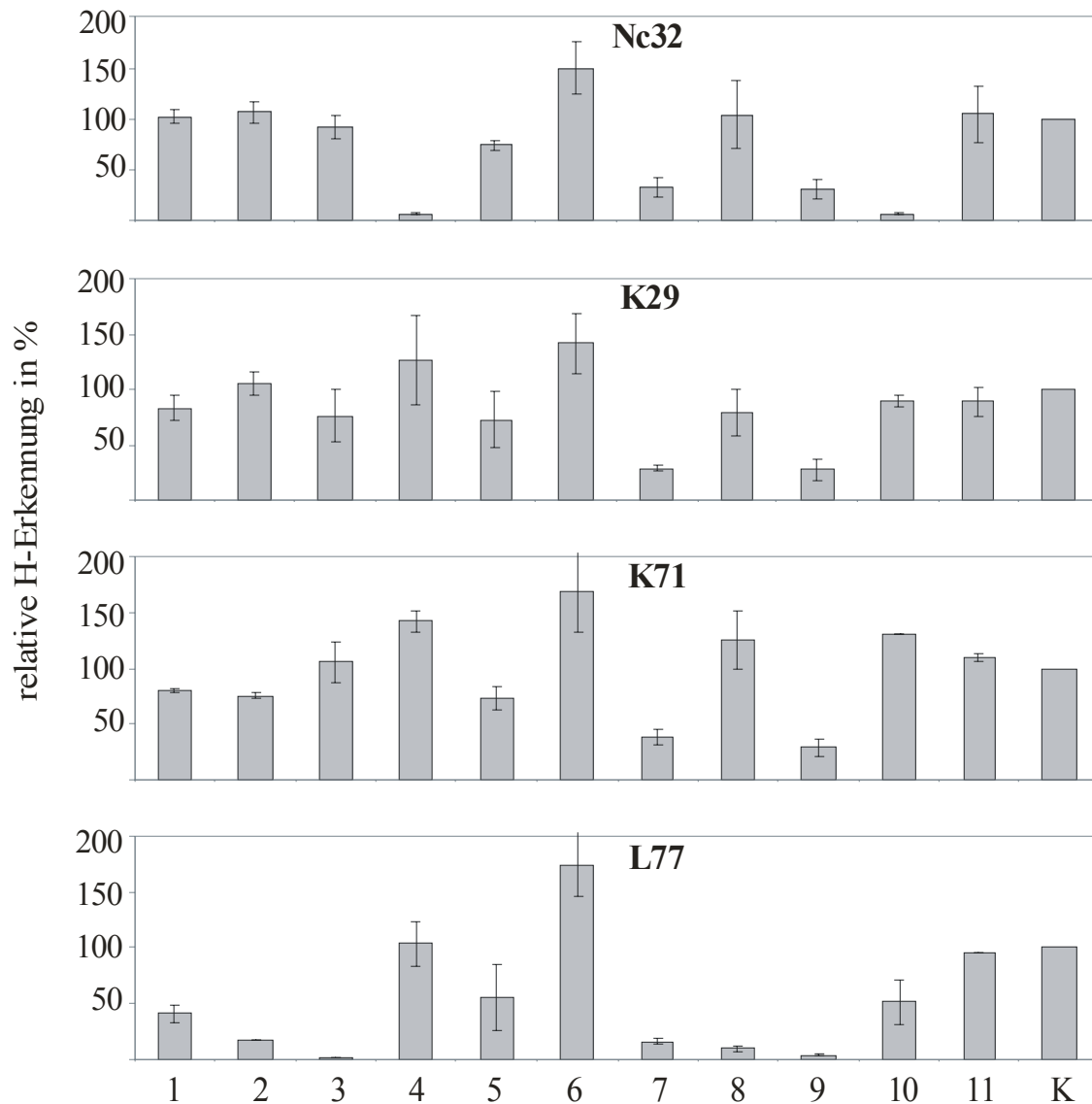


Abb. 4.2: FACS Analyse der rekombinanten Escape-Mutanten. Die Expression des H- und F-Proteins auf der Oberfläche von infizierten BJAB mit EdtagCAMHmt1 bis EdtagCAMHmt11 (Balken 1 – 11, entsprechend) und EdtagCAMH (K) wurde bestimmt durch Doppelfärbung mit anti-MV-H (L77, Nc32, K71 und K29) und dem anti-MV-F-Ak. Die Signalintensität von EdtagCAMH infizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt und die Intensität der anderen H-Signale dazu in Relation gesetzt.

Aus diesen Versuchsdaten wurde deutlich, dass die Mutationen, die in die rekombinanten EdtagCAMHmt5, EdtagCAMHmt6 und EdtagCAMHmt11 eingeführt worden sind, um einen K29 und K71 Escape zu erreichen, dies nicht konnten. Dagegen vermittelte die Mutationen an der Stelle 1182 in den Mutanten EdtagCAMHmt4 und EdtagCAMHmt10 den Escape von Antikörper Nc32. Die Mutationen an den Stellen 1150 und 1153 vermittelten in den Mutanten EdtagCAMHmt1, EdtagCAMHmt2, EdtagCAMHmt3, EdtagCAMHmt7, EdtagCAMHmt8 und EdtagCAMHmt9 den Escape von Antikörper L77.

4.1.5 Tierversuche zur Neurovirulenz der ersten rekombinanten Viren

Zur Untersuchung des Neurovirulenzverhaltens der ersten rekombinanten Viren (EdtagCAMHmt1 - EdtagCAMHmt5) im Lewis-Ratten Modell, wurden 1-2 Tage alte Ratten infiziert und als ein Merkmal der Pathogenität des Virus die Verminderung im Zuwachs des Körpergewichtes nach der Infektion ermittelt.

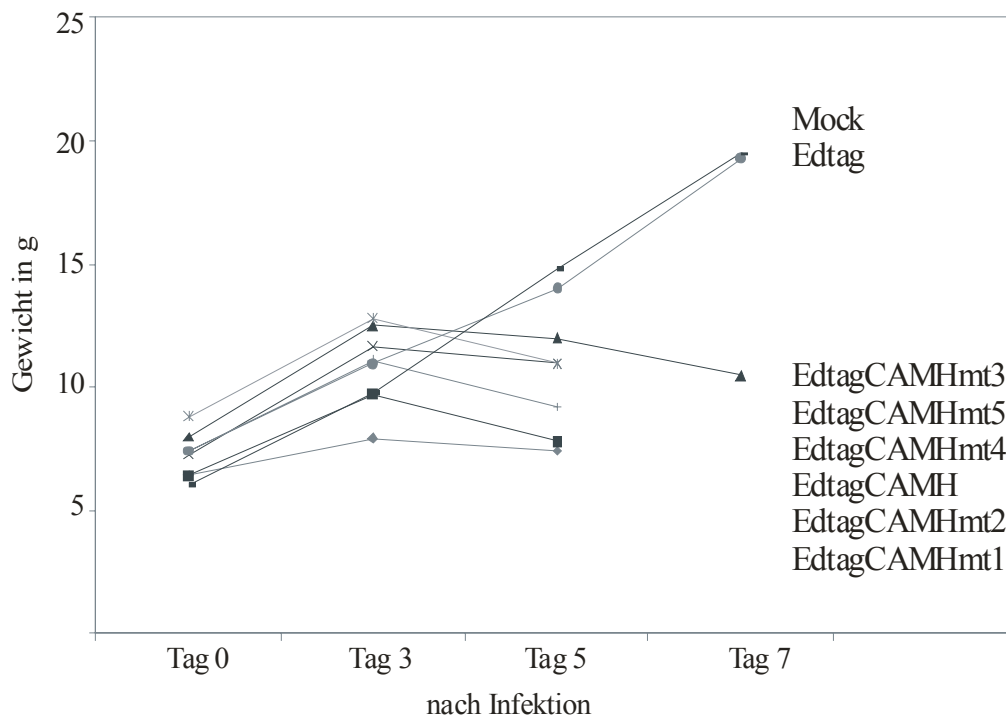


Abb. 4.3: Analyse des Körpergewichtes von i.c. infizierten Ratten. 1-2 Tage alten Ratten wurden 20 μ l (= 1-2 $\times 10^4$ pfu) Virussuspension (die rekombinanten Viren EdtagCAMHmt1 - EdtagCAMHmt5 und als Kontrollen Edtag und Mock) in die linke Hemisphäre injiziert. Das Körpergewicht wurde am Tag 0, 3, 5 und 7 nach Infektion ermittelt.

Die Tiere zeigten ab Tag 3 erste Auffälligkeiten in ihren Bewegungsabläufen, das Gewicht der Tiere nahm von diesem Zeitpunkt an nicht mehr zu, sondern ab und die ersten Tiere verstarben bereits am Tag 4 nach der Infektion. Diejenigen Tiere, die mit einer Mock-Präparation oder mit dem Edtag-Stamm infiziert wurden, zeigten ein ganz normales Verhalten, sowohl was die Gewichtszunahme als auch ihr motorisches Verhalten betrifft. Die Tiere, die mit den rekombinanten Viren EdtagCAMHmt1 bis EdtagCAMHmt5 infiziert waren, zeigten ein identisches Verhalten zu den Tieren, die mit dem EdtagCAMH-Stamm infiziert wurden, der auch im Mausmodell für sein neurotropes Verhalten beschrieben wurde.

4.1.6 Erste Immunhistologie Ergebnisse

Die Gehirne der infizierten Tiere wurden direkt nach der Präparation in Paraformaldehyd aufbewahrt und für die weiteren Analysen nach Tübingen zu Herrn Prof. Meyermann geschickt und dort analysiert.

Tab. 4.3: Eine Übersicht der ersten immunhistologischen Ergebnisse. Die entnommenen Gehirne wurden in Paraformaldehyd eingelegt und nach Tübingen geschickt. Dort wurden die Gehirne für die Histologie entsprechend präpariert und mit dem anti-MV-F-Ak F227 gefärbt.

Injiziertes Agens	Tage nach Infektion	Parafin Block	Immunhistologie F227	
			1	2
Mock	0	1	-	-
	3	1	-	-
	5	1	-	-
	7	1	-	-
Edtag	3	1	-	-
		2	-	-
	5	1	-	-
		2	?	?
	7	1	?	?
		2	-	-
EdtagCAMH	14	1	?	?
		2	?	?
	3	1	++	xx
		2	+	xx
EdtagCAMHmt1	5	1	+++	xxx
		2	++	xx
EdtagCAMHmt2	3	1	++	xx
		2	+++	xx
	5	1	+++	xx
EdtagCAMHmt3		2	+++	xxx
	3	1	-	-
		2	?	?
EdtagCAMHmt4	5	1	++	xx
		2	++	x
	3	1	+	x
		2	++	xx
EdtagCAMHmt5	5	1	++	x
		2	++	xx
	3	1	++	x
		2	+	x
	5	1	++	xx
		2	++	xx

1 = Immunreaktivität (von Nervenzellen/Gliazellen)

-/? : keine/keine sichere Immunreaktivität

+: kleine oder schwache Foci

++: größere oder kräftigere Foci

+++ : besonders ausgeprägter Befund

2 = Foci

-/? : keine /keine sicheren Foci

x: 1 – 4 Foci

xx: 5 – 9 Foci

xxx: > 9 Foci

Der Tabelle kann entnommen werden, dass sich in allen Hirnen, denen entweder EdtagCAMH oder die Mutanten 1-5 injiziert wurden, Virus mit Hilfe des MV-Nukleokapsid-Antikörpers F227 nachweisen lässt. Sowohl bei der Mock-Präparation als auch bei dem Edtag-Stamm, konnten keine MV spezifischen Signale detektiert werden. Die in 4.1.5 und 4.1.6 erzielten Ergebnisse belegen eindeutig, dass entgegen aller Erwartung alle bis dahin erzeugten Rekombinanten (EdtagCAMHmt1 - EdtagCAMHmt5) neurovirulent sind.

4.1.7 Sequenzierung der natürlichen Mutanten CAM/K71 und CAM/K29 auf zusätzliche Mutationen

Obwohl die Mutanten EdtagCAMHmt5 und EdtagCAMHmt6 als Escape-Mutanten für K71 und K29 konstruiert wurden, waren in den FACS-Analysen noch keine rekombinanten Escape-Mutanten gegen die mAk K71 und K29 gefunden worden. Deshalb wurden die natürlichen Escape-Mutanten, die in der Veröffentlichung von Liebert *et al.*, 1994 beschrieben sind, noch einmal sequenziert. Mit der Annahme, dass noch zusätzliche Mutationen im H-Gen vorhanden sind, die bisher nicht beschrieben worden sind. Dieses kann der Grund dafür sein, dass es bei den rekombinanten Mutanten EdtagCAMHmt5 und EdtagCAMHmt6 nicht zu dem erwarteten Escape kommen konnte.

Tab. 4.4: Bei den natürlichen Escape-Mutanten CAM/K71 und CAM/K29 durch Sequenzierung gefundene zusätzliche Mutationen (in rot).

Virus Bezeichnung	Sequenzänderungen in den mutierten Viren		Neurovirulenz der Mutante (nach Liebert <i>et al.</i> , 1994)
	Nukleotide	Aminosäuren	
CAM/L77	603, 619 1150, 1153	195 Gly → Arg, 200 Ser → Asn 377 Arg → Gln, 378 Met → Lys	ja
CAM/Nc32	603, 619 1182	195 Gly → Arg, 200 Ser → Asn 388 Gly → Ser	ja
CAM/K29	603, 619 1624	195 Gly → Arg, 200 Ser → Asn 535 Glu → Gly	nein
CAM/K71	603, 619 1203 1494, 1668	195 Gly → Arg, 200 Ser → Asn 395 Glu → Lys 492 Glu → Lys, 550 Ser → Pro	nein

Wie man anhand der Tabelle erkennen kann, wurde eine zusätzliche Mutation in der CAM/K29 Mutante gefunden und zwei weitere Mutationen in der CAM/K71 Mutante. Mit der Annahme, dass es sich bei diesen zusätzlichen Mutationen um diejenige handelt, die für den Antikörperescape verantwortlich sind, wurden diese zusätzlichen Mutationen in die

rekombinanten Viren EdtagCAMHmt12, auf der Basis der CAM/K71 Mutante und EdtagCAMHmt13 auf der Basis der CAM/K29 Mutante konstruiert.

4.1.8 Charakterisierung der neuen rekombinanten EdtagCAMHmt12 und EdtagCAMHmt13

Die beiden neuen rekombinanten Viren wurden ebenfalls in der FACS-Analyse auf ihr Antikörperverhalten getestet.

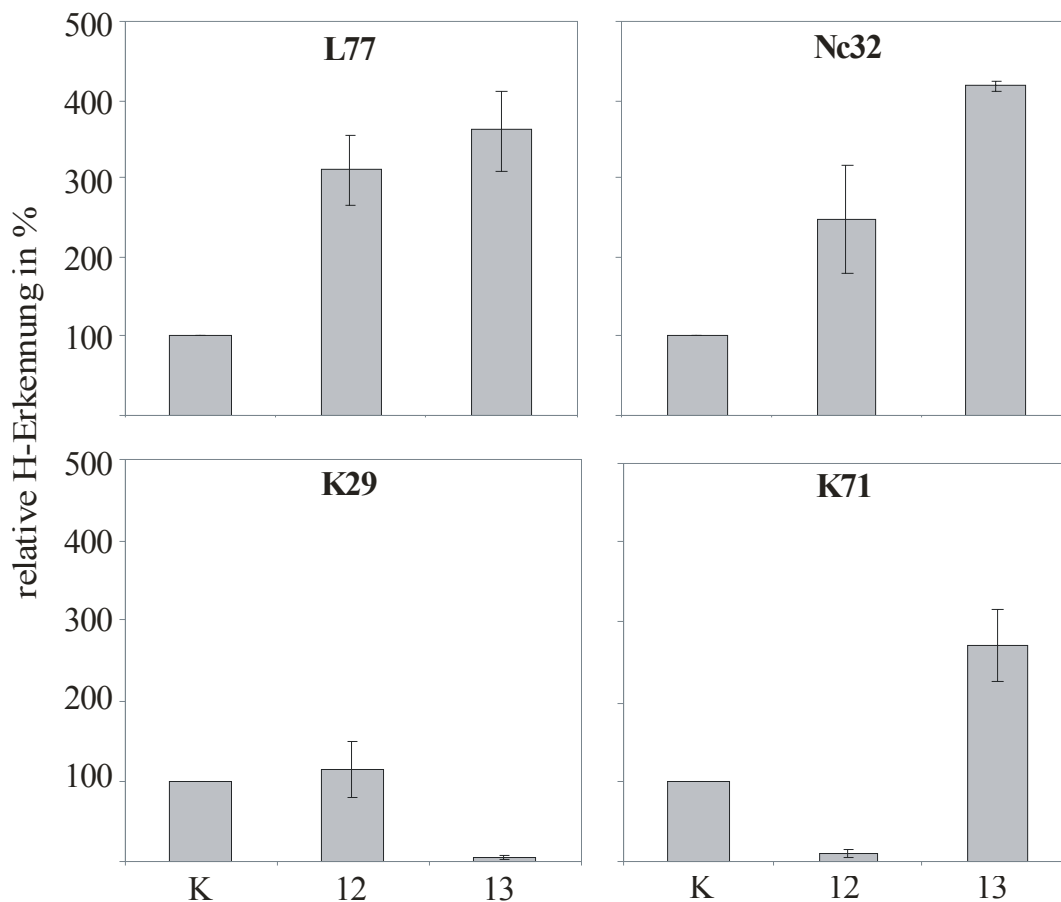


Abb. 4.4: FACS Analyse der neuen rekombinanten Escape-Mutanten. Die Expression des H- und F-Proteins auf der Oberfläche von infizierten BJAB mit EdtagCAMHmt12 und EdtagCAMHmt13 (entsprechend Balken 12 und 13) und EdtagCAMH (K) wurde bestimmt durch Doppelfärbung mit anti-MV-H (L77, Nc32, K29 und K71) und anti-MV-F-Ak. Die Signalintensität von EdtagCAMH infizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt und die Intensität der anderen H-Signale dazu in Relation gesetzt.

Wie man der Abb. 4.4 entnehmen kann zeigen die beiden neuen rekombinanten Viren jeweils den entsprechenden Antikörperescape. Es standen nun für jeden mAk (L77, K29, K71 und Nc32) rekombinante Escape-Viren zur Verfügung, mit denen das neurovirulente Verhalten untersucht werden sollte.

4.1.9 Tierversuche der rekombinanten Viren EdtagCAMHmt6 bis EdtagCAMHmt13

Im Anschluss an die FACS-Analysen zur Überprüfung des Antikörperverhaltens, wurde der zweite Tierversuch mit den übrigen rekombinanten Viren EdtagCAMHmt6 bis EdtagCAMHmt13 durchgeführt.

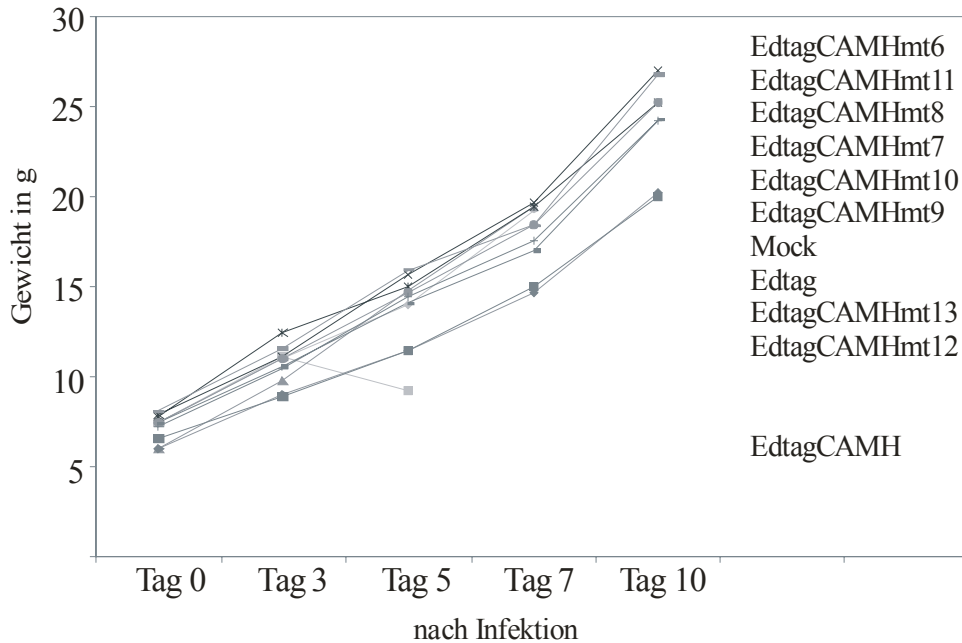


Abb. 4.5: Analyse des Körpergewichtes von i.c. infizierten Ratten. 1-2 Tage alten Ratten wurden $20\mu\text{l}$ ($= 1-2 \times 10^4$ pfu) Virussuspension (EdtagCAMHmt6-13 und als Kontrollen Mock, Edtag und EdtagCAMH) in die linke Hemisphäre injiziert. Das Körpergewicht wurde am Tag 0, 3, 5, 7 und 10 nach Infektion ermittelt.

In diesem Tierversuch zeigte sich keine Neurovirulenz der rekombinanten Viren EdtagCAMHmt6 bis einschließlich EdtagCAMHmt13. Zur Kontrolle wurden Tiere mit dem als neurovirulent bekannten EdtagCAMH infiziert und als Negativkontrolle wurden Tiere mit einer Mock-Präparation infiziert. Die mit den rekombinanten Viren EdtagCAMHmt6-13 infizierten Tiere zeigten ein vollkommen normales Verhalten. Die Tiere, die mit den beiden rekombinanten EdtagCAMHmt12 und EdtagCAMHmt13 infiziert wurden, hatten einen etwas geringeren Gewichtszuwachs, der jedoch in der Tendenz parallel zu den anderen Kurven verlief.

Die in Tabelle 4.2 beschriebene zu erwartende Neurovirulenz der rekombinanten Viren wurde also nicht experimentell bestätigt. Dagegen waren die Mutanten EdtagCAMHmt1-5 virulent und die Mutanten EdtagCAMHmt6-13 nicht neurovirulent. Es galt also die Frage zu klären, welche Sequenzunterschiede im H-Protein tatsächlich zu der unterschiedlichen Virulenz führen.

4.1.10 Tierversuch zur Neurovirulenz der natürlichen Mutanten

Aufgrund der in Versuch 4.1.5 gemachten Ergebnisse, dass die eigentlich als nicht mehr neurovirulent beschriebene K71 Escape-Mutante (EdtagCAMHmt5) noch neurovirulent ist, sollten die Ergebnisse von Liebert *et al.* noch einmal nachgeprüft werden. Deshalb wurden die natürlichen Escape-Mutanten CAM/K29, CAM/K71, CAM/Nc32 und CAM/L77 noch einmal im Tiermodell getestet.

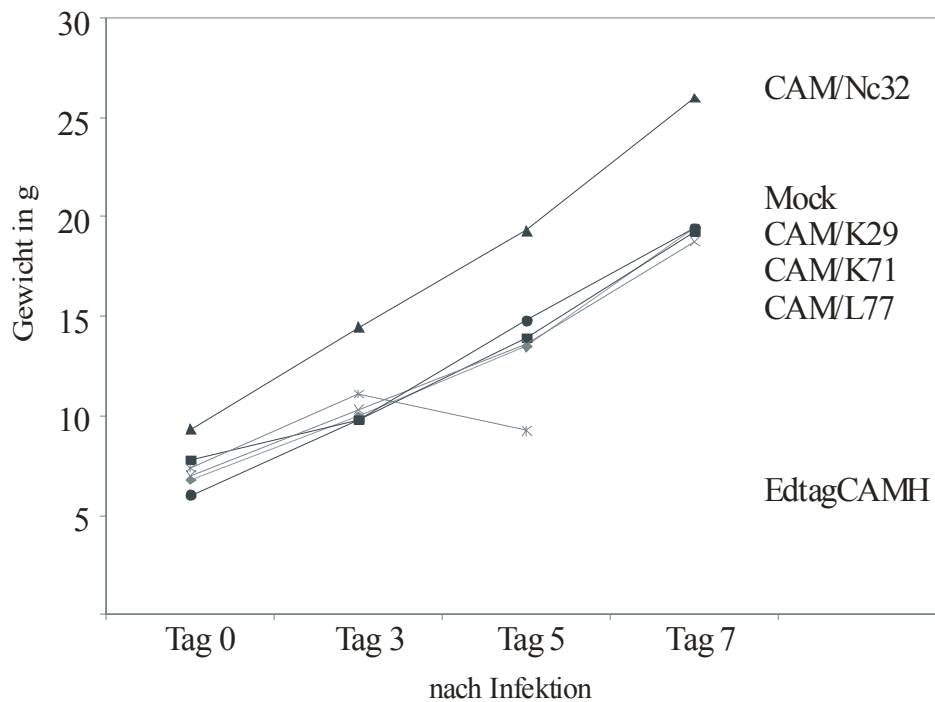


Abb. 4.6: Analyse des Körpergewichtes von i.c. infizierten Ratten. 1-2 Tage alten Ratten wurden 20µl Virussuspension (= $1-2 \times 10^4$ pfu) in die linke Hemisphäre injiziert. Das Körpergewicht wurde am Tag 0, 3, 5 und 7 nach Infektion ermittelt.

Wie anhand der Graphik zu sehen ist, konnten die Ergebnisse aus der Veröffentlichung mit diesen Viren nicht bestätigt werden. Die eigentlich als neurovirulent beschriebenen Escape-Mutanten CAM/L77 und CAM/Nc32 verhalten sich, wie die Mock-Kontrolle und die als nicht neurovirulent beschriebenen Mutanten CAM/K29 und CAM/K71, alle nicht neurovirulent. Nur die Rekombinante EdtagCAMH war neurovirulent. Die bis dahin erzielten Ergebnisse warfen die Frage auf, ob die von Liebert *et al.*, 1994 veröffentlichten Sequenzen der H-Proteine der natürlichen Escape-Mutanten richtig und vollständig sequenziert wurden.

4.1.11 Tierversuch mit verschiedenen CAM-Stämmen

Nach dem Tierversuch mit den rekombinanten Viren wurden Tierversuche durchgeführt mit zwei CAM-Stämmen. Der Grund für die Analyse dieser Stämme lag darin, zu untersuchen, ob noch andere Sequenzunterschiede im H-Gen, die für die Neurovirulenz wichtig sind, bei diesen vorhanden sind. Der CAM/RB-Stamm war ausschließlich über Rattenhirne passagiert worden und der andere CAM-Stamm, zeichnete sich nur dadurch aus, dass er in Zellkultur über Vero-Zellen passagiert worden war. Die Verwendung dieser an Vero-Zellen adaptierte CAM-Variante begründete sich aus den Ergebnissen mit den natürlichen Mutanten. Diese wurden an Vero-Zellen adaptiert und hatten ihre Neurovirulenz verloren. Das Ergebnis dieses Versuches ist in Abb. 4.7 zu sehen.

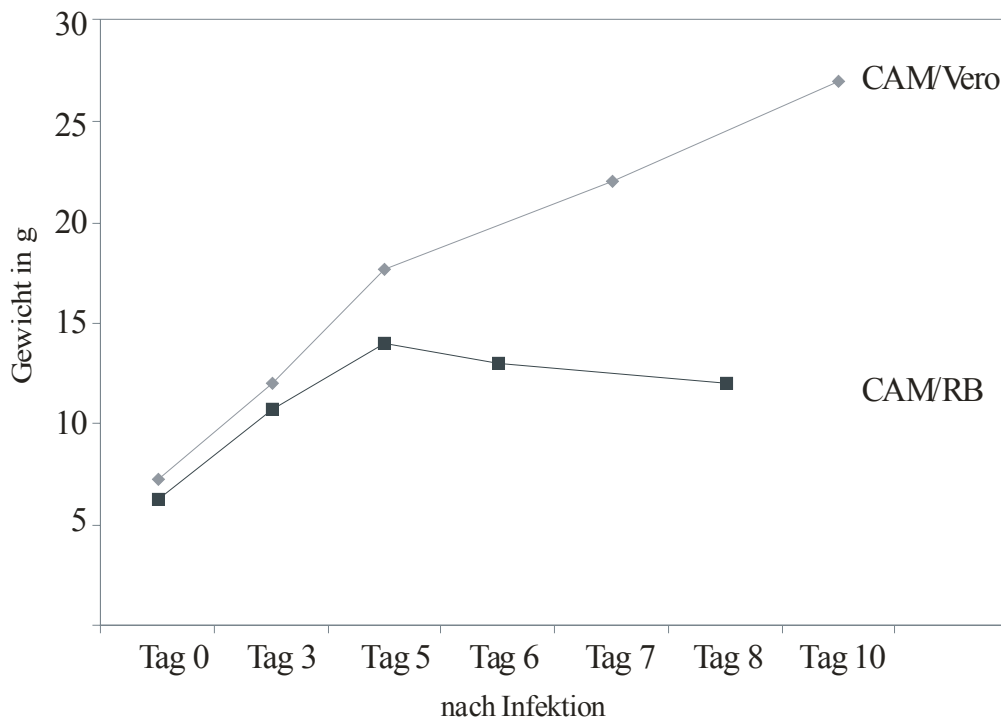


Abb. 4.7: Analyse des Körpergewichtes von i.c. infizierten Ratten. 1-2 Tage alten Ratten wurden 20µl Virussuspension (CAM/RB = 1×10^3 pfu und CAM/Vero = 2×10^4 pfu) in die linke Hemisphäre injiziert. Das Körpergewicht wurde am Tag 0, 3, 5, 6, 7, 8 und 10 nach Infektion ermittelt.

Die MV CAM/RB Variante zeigt das typische Verhalten dieses neurotrophen Stammes, die Tiere werden krank, zeigen einen deutlichen Gewichtsverlust und versterben zwischen Tag 5 und 8 nach Infektion. Der zellkulturadaptierte CAM-Stamm (CAM/Vero) hingegen ist nicht mehr in der Lage eine Erkrankung der Tiere auszulösen, wie in Versuch 4.1.10 die zellkulturadaptierten natürlichen Mutanten. Die Tiere zeigen einen normalen Gewichtsverlauf, wie uninfizierte Tiere und zeigen auch keine Auffälligkeiten in ihren Bewegungsabläufen. Der etwas langsamere Infektionsverlauf bei CAM/RB infizierten Tieren

im Vergleich zu den Tieren, die mit den Rekombinanten EdtagCAMHmt1-5 infiziert wurden, liegt hier an der geringeren Infektionsdosis von nur 1000 Viren pro Injektionsvolumen im Vergleich zu ca. 20000 Viren.

4.1.12 Sequenzierung und Alignment verschiedener MV-Stämme

Aufgrund des Ergebnisses, dass der zellkulturadaptierte CAM/Vero Stamm seine Pathogenität verloren hat und um Nukleotidunterschiede, die möglicherweise durch die Anpassung an die Zellkultur entstanden sind, zu detektieren, wurden die H-Gene von mehreren Isolaten von CAM/Vero und CAM/RB mit unterschiedlichen Primern sequenziert und ein Alignment der Sequenzen durchgeführt. Ein Ausschnitt des Sequenzvergleiches ist in Abb. 4.8 gezeigt, bei dem die Sequenzen um die Nukleotidpositionen 603 und 619 dargestellt sind.

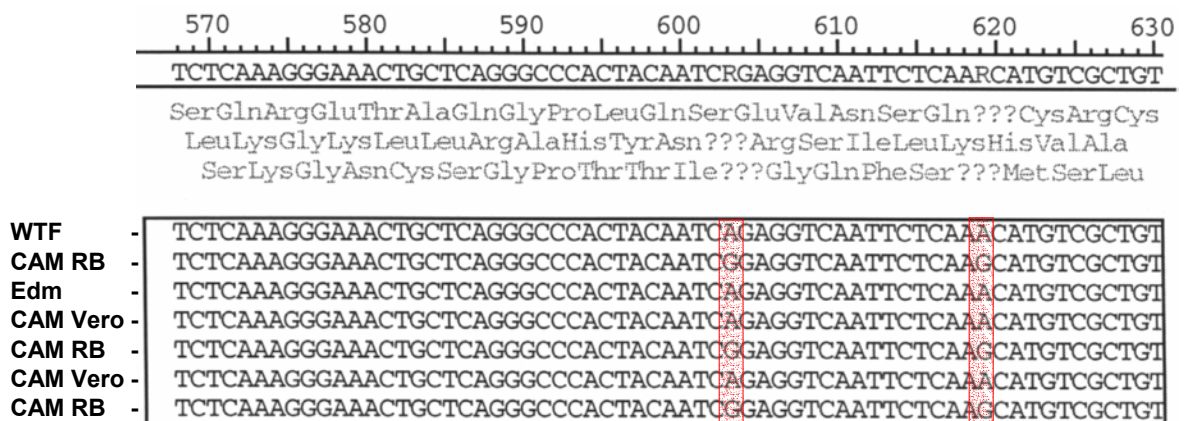


Abb. 4.8: Alignment verschiedener H-Sequenzen von MV-Stämmen. Vergleich der Sequenzen um die Nukleotidpositionen 603 und 619 im H-Gen der Stämme WTF, CAM/RB, Edm, CAM/Vero von unterschiedlichen Sequenzierungen mit den entsprechenden forward und reverse Primern.

Es wurde bei nicht neurovirulenten MV-Stämmen (WTF, Edm und CAM/Vero) in allen Sequenzen an den beiden Positionen 603 und 619 ein Adenin anstatt eines Guanins bei dem neurovirulenten CAM/RB Stamm gefunden. Diese Nukleotidverteilung ist auch bei den rekombinanten Viren vorhanden, die ein neurovirulentes Verhalten aufweisen (EdtagCAMHmt1-5). Diejenigen, die nicht neurovirulent sind, zeigen entsprechend ein Adenin (EdtagCAMHmt6-13). Es konnten nur diese beiden Austausche an den Positionen 603 und 619 als durchgängiges Muster bei den Viren beobachtet werden, die für die charakteristische Neurovirulenz verantwortlich sein können.

Schlussfolgerungen aus den bis hierher vorliegenden Ergebnissen:

Aus diesen Ergebnissen konnte geschlossen werden, dass diejenigen Mutationen, die für den jeweiligen Antikörperescape verantwortlich sind, nicht in Zusammenhang stehen mit denjenigen Mutationen, die für die Neurovirulenz verantwortlich sind.

Folgende Nukleotid- bzw. Aminosäureaustausche im H-Gen spielen bei der Antikörpererkennung bzw. -bindung eine Rolle. Bei Mutanten, die als Nukleotid ein Adenin anstatt eines Guanins an der Position 1150 tragen, was sich auf Aminosäureebene in einem Wechsel von Arginin zu Glutamin (377) äußert und/ oder ein Wechsel an der Position 1153 von Thymin nach Adenin bzw. von Aminosäureposition 378 Methionin zu Lysin, können nicht mehr mit dem Antikörper L77 interagieren. Der Antikörper Nc32 kann nicht mehr an das Hämagglutininprotein binden, wenn die Nukleotidposition 1182 von Guanin zu Adenin mutiert wurde, was auf Aminosäurebasis einen Wechsel von Glycin zu Serin an der Stelle 388 bedeutet. Für den Antikörper K29 hat ein Wechsel an Position 1624 von Adenin zu Guanin bzw. der Austausch der Aminosäure Glutaminsäure gegen Glycin an der Position 535 den Verlust der Bindung zur Folge. Und für den Antikörper K71 bedeutet der Wechsel von Guanin zu Adenin (Position 1494) und Thymin zu Cytosin (Position 1668) bzw. Glutaminsäure an der Position 492 zu Lysin und Serin zu Prolin an der Stelle 550 den Verlust der Bindungsfähigkeit. In Tabelle 4.5 wurden die Ergebnisse noch einmal zusammengefasst. Dabei spielt die Mutation an der Position 395 von Glutaminsäure zu Lysin, die laut Liebert für den K71 Antikörperescape verantwortlich sein soll, keine Rolle.

Tab. 4.5: Zusammenfassung der Nukleotid- bzw. der daraus resultierenden Aminosäurewechsel, die für den Verlust der Bindungseigenschaft der Antikörper an das Hämagglutinin verantwortlich sind.

Antikörper	Nukleotidwechsel	Aminosäurewechsel
L77	1150 G → A	377 Arginin → Glutamin
	1153 T → A	378 Methionin → Lysin
Nc32	1182 G → A	388 Glycin → Serin
K71	1494 G → A	492 Glutaminsäure → Lysin
	1668 T → C	550 Serin → Prolin
K29	1624 A → G	535 Glutaminsäure → Glycin

Dagegen war für die Neurovirulenz der Mutanten der Wechsel an den Positionen 603 und 619 von Nukleotid Adenin zu Guanin bzw. der Wechsel der Aminosäuren an Position 195 von Arginin zu Glycin bzw. Asparagin zu Serin verantwortlich. Der Wechsel von Asparagin zu Serin an der Position 200 zerstört eine potentielle Glykosylierungsstelle. Die Aminosäuresequenz im Hämagglutinin bei nicht neurovirulenten Viren ist an den Positionen

199-202: Serin – Asparagin – Methionin - Serin. Bei neurovirulenten Stämmen ergibt sich durch die Mutation an der Nukleotidstelle 619 folgende Abfolge: Serin – Serin - Methionin – Serin. Damit ist das Glykosylierungsmotiv (Asn – X - Ser/Thr) zerstört. In folgender Tabelle sind noch einmal die Austäusche dargestellt, die für die Neurovirulenz verantwortlich sind.

Tab. 4.6: Zusammenfassung der Nukleotid- bzw. der daraus resultierenden Aminosäurewechsel im Hämagglutinin, die für die Neurovirulenz von MV verantwortlich sind.

Nukleotidwechsel	Aminosäurewechsel
603 A → G	195 Arginin → Glycin
619 A → G	200 Asparagin → Serin

In wie fern es sich bei der Glykosylierungsstelle an der Position 200 um eine benutzte Glykosylierungsstelle handelt und welche Bedeutung eine Benutzung bzw. Verlust als Glykosylierungsstelle für die Neurovirulenz hat, sollte im Folgenden untersucht werden.

4.1.13 Funktionelle Untersuchung der Mutation an Position 200

Um zu untersuchen, ob die Glykosylierungsstelle, die durch die Mutation an Position 200 bei neurovirulenten Stämmen wegfällt, tatsächlich genutzt wird, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt.

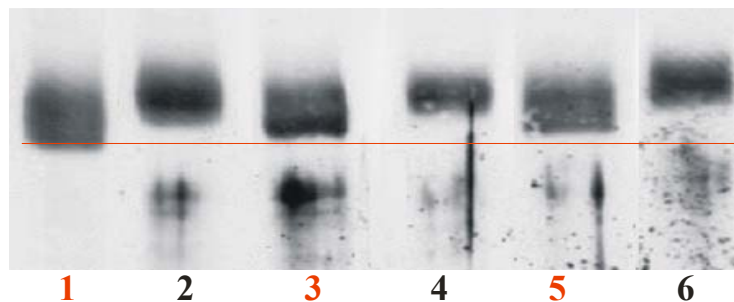


Abb. 4.9: Western-Blot-Analyse zum Nachweis des MV-H-Proteins mit einem polyklonalen Kaninchen-Serum. Rot nummerierte Spuren sind neurovirulente Viren (1, 3, 5), in schwarz nicht neurovirulente Viren (2, 4, 6). 1 = CAM/RB, 2 = CAM/Vero, 3 = EdtagCAMHmt1, 4 = EdtagCAMHmt7, 5 = EdtagCAMH, 6 = Edtag. Die rote Linie dient zur Verdeutlichung des Größenunterschiedes.

In Abb. 4.9 wurden die verschiedenen Viruspräparationen in gleicher Proteinkonzentration aufgetragen, jeweils die entsprechenden neurovirulenten und nicht neurovirulenten Stämme

nebeneinander. Anhand der eingezeichneten roten Linie kann man einen Unterschied in der Größe der detektierten H-Proteine erkennen, allerdings nicht so deutlich, betrachtet man sich die oberen Kanten der Banden, da die Banden relativ diffus sind.

Deshalb sind in Abb. 4.10 Virusproben aufgetragen worden, die vorher einer DMJ-Behandlung unterzogen worden waren. Die Behandlung mit DMJ bei der Viruszucht bewirkt die Arretierung der Glykosylierungsprozessierung im Golgi-Apparat, wobei die α 1,2-MannosidaseI blockiert wird, und so der Umbau von Zuckern des "high"-Mannose Typs zu komplexen Oligosacchariden unterbrochen ist. Die Proteine zeigen dadurch deutlichere Banden im Western-Blot wie in Abb. 4.10 zu sehen ist.

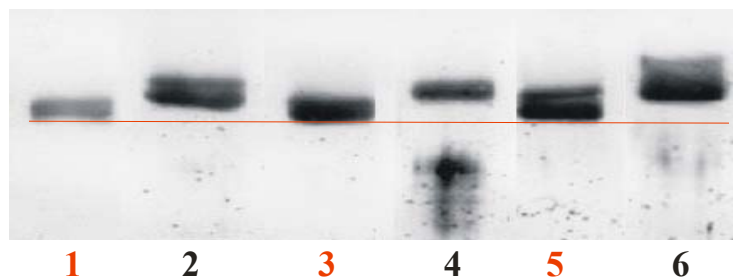


Abb. 4.10: Western-Blot-Analyse zur Detektion des MV-H-Proteins mit einem polyklonalen Kaninchen-Serum nachdem die Proben mit der chemischen Substanz DMJ behandelt wurden. In rot dargestellt sind neurovirulente Viren in schwarz nicht neurovirulente. 1 = CAM/RB, 2 = CAM/Vero, 3 = EdtagCAMHmt1, 4 = EdtagCAMHmt7, 5 = EdtagCAMH, 6 = Edtag.

Die H-Proteine der neurovirulenten Viren sind im Vergleich zu ihren entsprechenden nicht neurovirulenten Proteinen deutlich kleiner, was auf das Fehlen der Glykosylierungsstelle zurückzuführen ist.

Um letztlich wirklich sicher zu sein, dass der Größenunterschied der verschiedenen H-Proteine nur durch das Fehlen der einen Glykosylierungsstelle an Aminosäureposition 200 zustande gekommen ist, und nicht von anderen Faktoren abhängig ist, wurden die Viruspräparationen zusätzlich einem EndoglycosidaseH Verdau unterzogen. Weisen alle Proben nach der Enzym-Behandlung gleiche Größe im Western-Blot auf, so ist das unterschiedliche Laufverhalten der neurovirulenten und nicht neurovirulenten Viren tatsächlich nur auf die unterschiedliche Glykosylierung zurückzuführen. Da die EndoglycosidaseH nur Oligomannosen aber keine komplexen Oligosaccharide abbauen kann, ist es notwendig die Prozessierung der Glykoproteine an einer entsprechenden Stelle zu

unterbrechen, um dem Enzym einen Angriffspunkt zu bieten, dieses wurde mit der DMJ-Vorbehandlung erreicht.

In Abb. 4.11 wurden der Übersichtlichkeit wegen nur der neurovirulente Stamm CAM/RB dem nicht neurovirulenten Stamm CAM/Vero gegenüber gestellt.

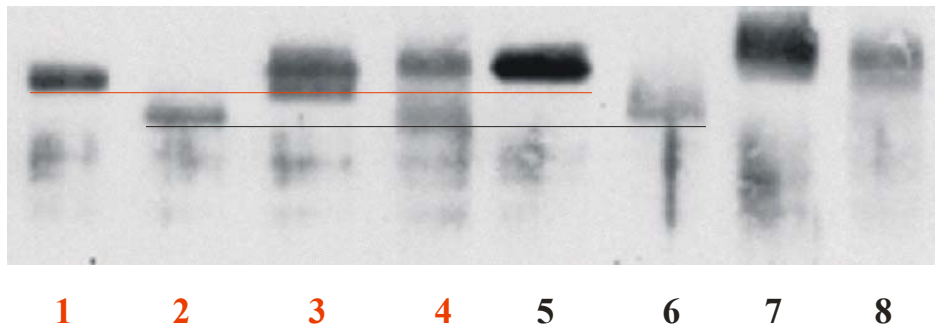


Abb. 4.11: Western-Blot-Analyse zum Nachweis des MV-H-Proteins mit einem polyklonalen Kaninchen-Serum. Gegenüberstellung der vier Proben des neurovirulenten Stammes CAM/RB und des nicht neurovirulenten Stammes CAM/Vero. In rot dargestellt ist der neurovirulente CAM/RB Stamm, Spur 1 = mit DMJ, Spur 2 = mit DMJ und EndoH, Spur 3 = ohne Behandlung und Spur 4 = nur EndoH. In schwarz ist der nicht neurovirulente CAM/Vero Stamm dargestellt. Spur 5 = mit DMJ, Spur 6 = mit DMJ und EndoH, Spur 7 = ohne Behandlung und Spur 8 = nur EndoH.

Anhand der roten Linie kann man gut den Größenunterschied der Proteine in Spur 1 und 5 erkennen. Diese Proben wurden im Vergleich zu den Proben in Spuren 3 und 5 mit DMJ behandelt, um klarere Banden zu erzielen. Anhand der schwarzen Linie ist ersichtlich, dass nach dem zusätzlichen EndoglycosidaseH Verdau die Proben in den Spuren 2 und 6 ein gleiches Laufverhalten aufweisen. Diese Daten belegen, dass nur die Glykosylierung für den Größenunterschied verantwortlich ist.

4.1.14 Konstruktion von Einzelmutanten

Anhand der Ergebnisse wurde deutlich, dass die unterschiedliche Neurovirulenz nur von den Aminosäureaustauschen an den Positionen 195 und 200 abhängt. Ob allerdings beide Mutationen notwendig sind, oder ob alleine das Fehlen der Glykosylierungsstelle an der Position 200 verantwortlich ist, sollte mit rekombinanten Viren untersucht werden, die jeweils nur eine der beiden Mutationen tragen. Daher wurde die Mutante EdtagCAMHmt14 konstruiert, die nur den Austausch an der Nukleotidposition 619 von Adenin zu Guanin besitzt, was auf Aminosäureebene an der Position 200 Serin anstatt Asparagin und damit den Wegfall der Glykosylierungsstelle bedeutet. Darüber hinaus wurde die Mutante EdtagCAMHmt15 konstruiert, die den Austausch an der Position 603 von Adenin zu Guanin besitzt, was den Wechsel von der Aminosäure Arginin zu Glycin an Position 195 zur Folge hat. Zur Konstruktion dieser Mutanten siehe Methoden 3.2.10.

4.1.15 Analyse des Wachstumsverhaltens dieser Einzelmutanten

Folgende Wachstumsstudien der Viren sollten klären, ob die Mutationen die zur Neurovirulenz führen auf das Wachstumsverhalten der Viren in Zellkultur einen Einfluss haben und ob im Umkehrschluss vom Wachstumsverhalten in Zellkultur auf die Neurovirulenz geschlossen werden kann. Es wurde freigesetztes Virus, das sich im Kulturüberstand befand, und zellgebundenes Virus, dessen Titer nach einem Zyklus Einfrieren und Auftauen bestimmt wurde, quantifiziert.

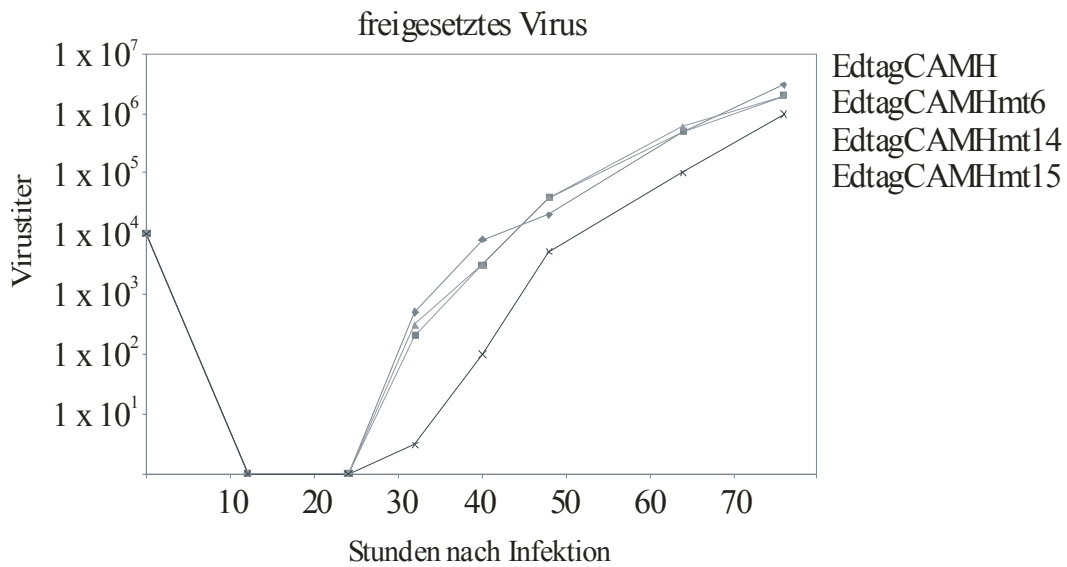


Abb. 4.12: Titrationskurven des freigesetzten Virus im Kulturüberstand nach 12, 24, 32, 40, 48, 64 und 76 Stunden nach der Infektion. 1×10^6 Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert. Dargestellt sind: die nichtneurovirulente Rekombinante EdtagCAMHmt6, die neurovirulente Rekombinante EdtagCAMH und die beiden Einzelmutanten EdtagCAMHmt14 und EdtagCAMHmt15.

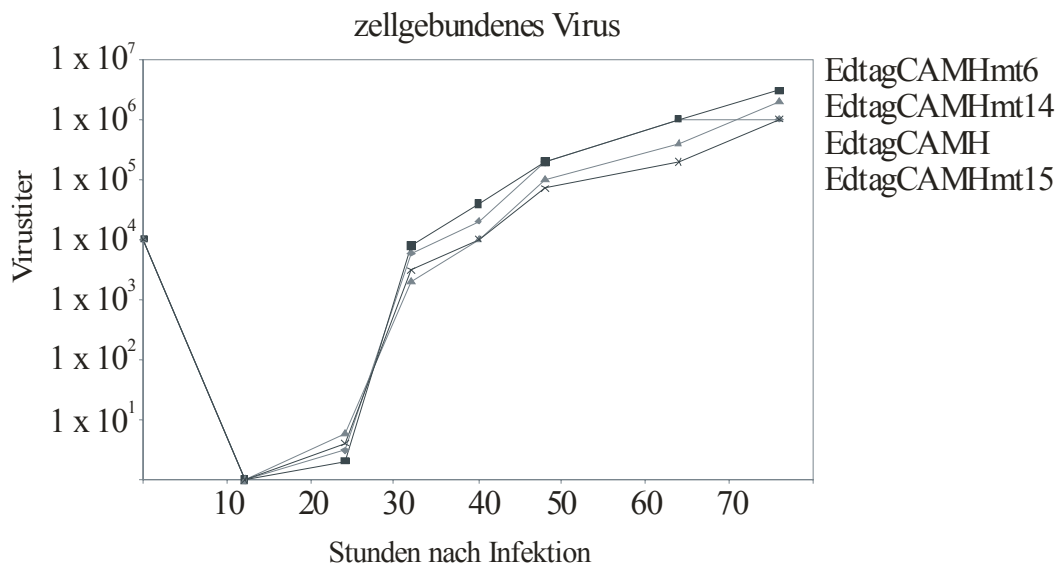


Abb. 4.13: Titrationskurven des zellgebundenen Virus nach 12, 24, 32, 40, 48, 64 und 76 Stunden nach der Infektion. 1×10^6 Zellen wurden mit einer MOI von 0,01 infiziert. Dargestellt sind: die nichtneurovirulente Rekombinante EdtagCAMHmt6, die neurovirulente Mutante EdtagCAMH und die beiden Einzelmutanten EdtagCAMHmt14 und EdtagCAMHmt15.

Wie man anhand der Wachstumskurven erkennen kann, replizieren die beiden Einzelmutanten EdtagCAMHmt14 und EdtagCAMHmt15 ähnlich gut und setzen etwa gleiche Mengen an infektiösem Virus frei. Sowohl das zellgebundene Virus als auch das freigesetzte Virus erreichen nach 76 Stunden ihre maximalen Titer von ca. 10^6 pfu. Auch im Vergleich zu den beiden anderen Viren zeigen diese Einzelmutanten ein sehr ähnliches Wachstumsverhalten in Vero-Zellen.

4.1.16 Glykosylierungsanalyse der Einzelrekombinanten durch den Western-Blot

Anhand der Sequenzierung wurde zwar schon die Richtigkeit der Mutationen auf Nukleotidebene im H-Gen dieser Rekombinanten überprüft (nicht gezeigt), aber die Richtigkeit der Funktionalität bezüglich der Glykosylierung, sollte im Western-Blot untersucht werden. In FACS-Analysen zur Überprüfung der Antikörperbindungsfähigkeit (Ergebnis ist in Abb. 4.16, in der Zusammenfassung der Daten gezeigt) zeigten alle getesteten Antikörper eine sehr gute Bindung ähnlich der Bindung an EdtagCAMH. Die Mutationen, die für den Antikörperescape verantwortlich sind, spielen zwar nachgewiesener Weise keine Rolle für die Neurovirulenz, dienten aber zur Charakterisierung. Es fand dieselbe Behandlung der Proben mit DMJ und EndoglycosidaseH statt (wie oben beschrieben) und das Ergebnis ist in Abb. 4.14 zu sehen.

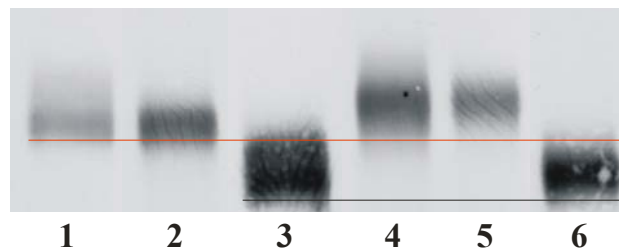


Abb. 4.14: Western-Blot-Analyse zum Nachweis des MV-H-Proteins mit einem polyklonalen Kaninchen-Serum. Gegenüberstellung der Rekombinanten EdtagCAMmt14 und EdtagCAMmt15. Spur 1 = Rekombinante 14 ohne Behandlung, Spur 2 = Rekombinante 14 mit DMJ, Spur 3 = Rekombinante 14 mit DMJ und EndoH. Spur 4 = Rekombinante 15 ohne Behandlung, Spur 5 = Rekombinante 15 mit DMJ und Spur 6 = Rekombinante 15 mit DMJ und EndoH. Die rote Linie dient zur Verdeutlichung des Größenunterschiedes der beiden Rekombinanten und die schwarze Linie verdeutlicht gleiches Laufverhalten der beiden Proben nach DMJ und EndoH-Behandlung.

Wie auf Grund der Mutation erwartet wurde, ist das Molekulargewicht der Mutante EdtagCAMHmt14 aufgrund der fehlenden Glykosylierungsstelle kleiner als das der Rekombinanten EdtagCAMHmt15.

4.1.17 Tierversuche mit diesen Einzelmutanten zur Bestimmung ihrer Neurovirulenz

Welche der beiden Mutationen nun für die Neurovirulenz verantwortlich ist, oder ob beide Mutationen in Kombination eine Rolle spielen, wurde im Tierversuch ermittelt. Als Kontrollen dienten die neurovirulente Rekombinante EdtagCAMHmt1 und die nicht neurovirulente Mutante EdtagCAMHmt6. Die Mutante EdtagCAMHmt14 basiert auf der 619er Mutation und die Rekombinante EdtagCAMHmt15 auf der 603er Mutation.

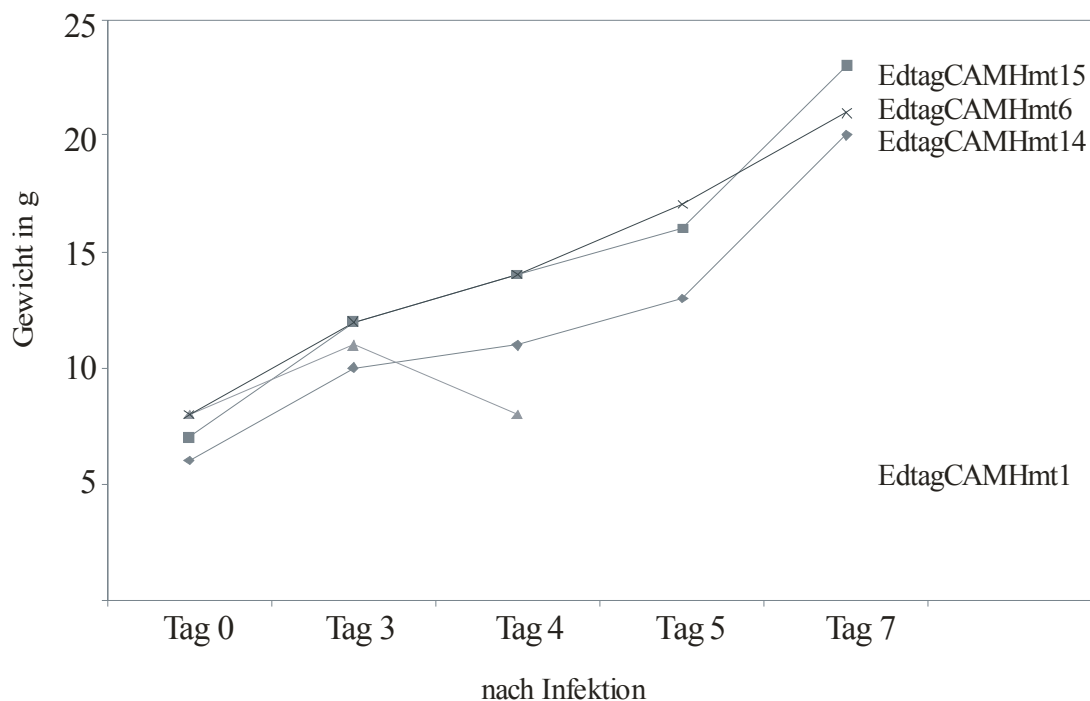


Abb. 4.15: Analyse des Körpergewichtes von i.c. infizierten Ratten. 1-2 Tage alten Ratten wurden $20\mu\text{l}$ ($= 2 \times 10^4$ pfu) Virussuspension (EdtagCAMHmt14 und EdtagCAMHmt15 und als Kontrollen EdtagCAMHmt1 und EdtagCAMHmt6) in die linke Hemisphäre injiziert. Das Körpergewicht wurde am Tag 0, 3, 4, 5 und 7 nach Infektion ermittelt.

In diesem Versuch wurde deutlich, dass nur beide Mutationen an den Stellen 603 und 619 in Kombination zur Neurovirulenz des Virus führen. Die mit den Einzelmutanten infizierten Tiere zeigen keine Krankheitsanzeichen und verhalten sich wie die als nicht neurovirulent beschriebene Mutante EdtagCAMHmt6.

4.1.18 Zusammenstellung der Daten der rekombinanten Viren

In der folgenden Tabelle sind alle rekombinanten Viren mit den jeweiligen Mutationen im H-Gen sowohl auf Nukleotidebene als auch auf Aminosäurebasis dargestellt.

Tab. 4.7: Zusammenstellung aller rekombinanten Viren mit ihren Nukleotidaustauschen und den entsprechenden Aminosäuren im H-Gen.

Virus	Nukleotid an Position 603 619	weitere Nukleotid- austausche	Aminosäure an Position 195 200	weitere Aminosäure- austausche
Edtag	A A	keine	Arg Asn	
EdtagCAMH	G G	keine	Gly Ser	
EdtagCAMHmt1	G G	1150 G → A	Gly Ser	377 Arg → Gln
EdtagCAMHmt2	G G	1153 T → A	Gly Ser	378 Met → Lys
EdtagCAMHmt3	G G	1150 G → A 1153 T → A	Gly Ser	377 Arg → Gln 378 Met → Lys
EdtagCAMHmt4	G G	1182 G → A	Gly Ser	388 Gly → Ser
EdtagCAMHmt5	G G	1203 G → A	Gly Ser	395 Glu → Lys
EdtagCAMHmt6	A A	keine	Arg Asn	
EdtagCAMHmt7	A A	1150 G → A	Arg Asn	377 Arg → Gln
EdtagCAMHmt8	A A	1153 T → A	Arg Asn	378 Met → Lys
EdtagCAMHmt9	A A	1150 G → A 1153 T → A	Arg Asn	377 Arg → Gln 378 Met → Lys
EdtagCAMHmt10	A A	1182 G → A	Arg Asn	388 Gly → Ser
EdtagCAMHmt11	A A	1203 G → A	Arg Asn	395 Glu → Lys
EdtagCAMHmt12	A A	1494 G → A 1668 T → C	Arg Asn	492 Glu → Lys 550 Ser → Pro
EdtagCAMHmt13	A A	1624 A → G	Arg Asn	535 Glu → Gly
EdtagCAMHmt14	A G	keine	Arg Ser	
EdtagCAMHmt15	G A	keine	Gly Asn	
CAM/RB	G G	keine	Gly Ser	
CAM/Vero	A A	keine	Arg Asn	

Die Aminosäuren, die für den Antikörperescape verantwortlich sind, stehen nicht mit denen für die Neurovirulenz im Zusammenhang. Für die Neurovirulenz der Viren sind die Aminosäureaustausche an den Stellen 195 zu Glycin und 200 zu Serin notwendig. Nur die Doppelmutanten zeigen Neurovirulenz und die Kombination der beiden Mutationen ist notwendig, was mit Hilfe der beiden Einzelmutanten gezeigt werden konnte. Viren mit den beiden Aminosäuren Arginin und Asparagin an den entsprechenden Positionen sind nicht neurovirulent.

4.1.19 Zusammenstellung der FACS-Analysen mit allen rekombinanten Viren

Im Folgenden sind noch einmal alle FACS-Ergebnisse zusammengestellt, die mit den rekombinanten Viren zur Überprüfung ihres Antikörperverhaltens durchgeführt worden sind.

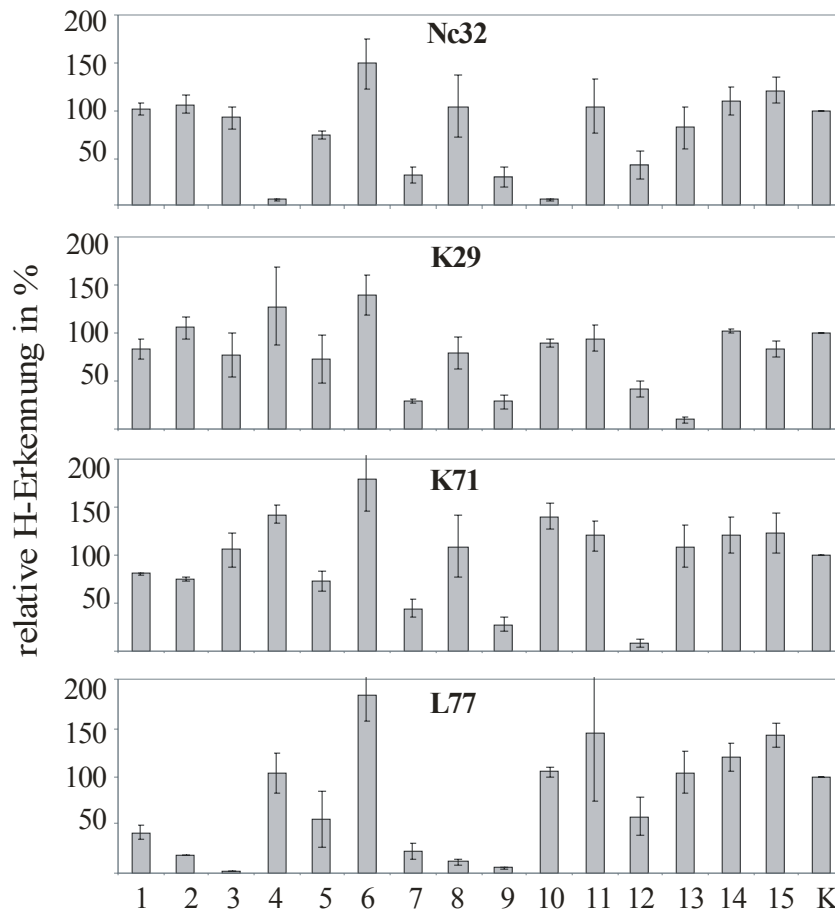


Abb. 4.16: FACS-Analysen aller rekombinanten Escape-Mutanten. Die Expression des H- und F-Proteins auf der Oberfläche von infizierten BJAB mit EdtagCAMHmt1 bis EdtagCAMHmt15 (Balken 1 – 15 entsprechend) und EdtagCAMH (K) wurde bestimmt durch Doppelfärbung mit anti-MV-H (L77, Nc32, K71 und K29) und anti-MV-F-Ak. Die Signalintensität von EdtagCAMH infizierten Zellen wurde auf 100% gesetzt und die Intensität der anderen H-Signale dazu in Relation gesetzt.

Anhand der rekombinanten Viren EdtagCAMHmt1 - EdtagCAMHmt15, die die Mutationen der natürlichen Escape-Mutanten nach Liebert *et al.* 1994 tragen und durch Sequenzierung zusätzlich aufgeklärte Austausche, konnten die einzelnen Aminosäuren bestimmt werden, die für die Bindung der Antikörper L77, NC32, K29 und K71 an das MV-Hämagglutininprotein verantwortlich sind. Der Antikörperescape und die Neurovirulenz korrelieren nicht.

4.1.20 Zusammenstellung der Tierversuche

In der Abb. 4.17 sind alle Tierexperimente zusammengestellt, die zur Aufklärung des neurovirulenten Verhaltens der Viren durchgeführt worden sind.

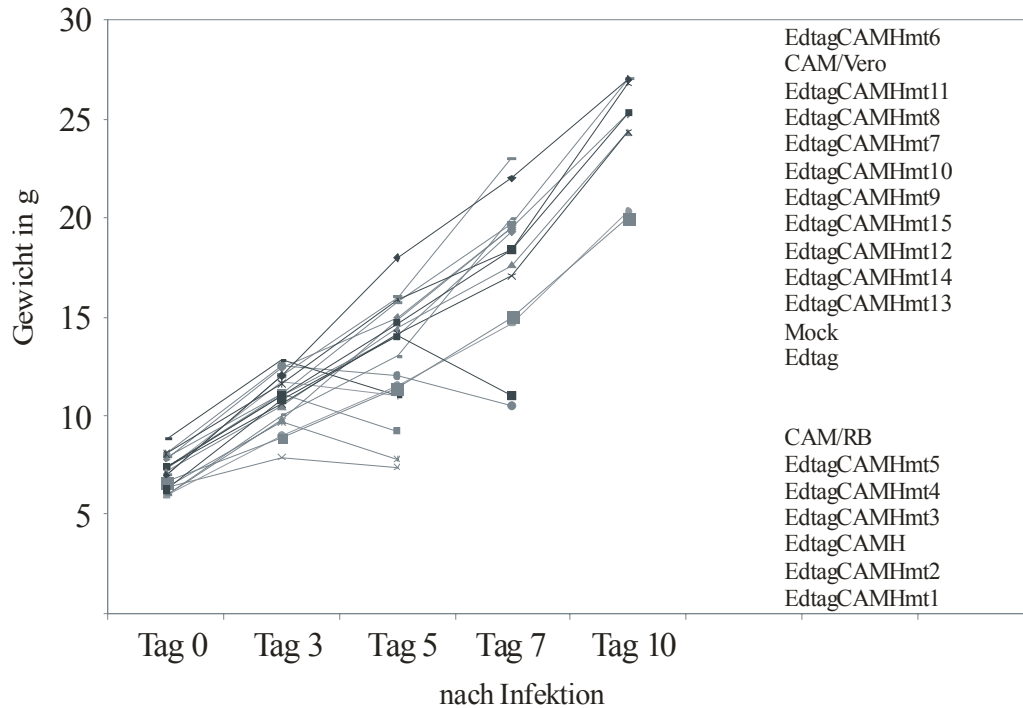


Abb. 4.17: Zusammenstellung aller Tierexperimente. Analyse des Körpergewichtes von i.c. infizierten Ratten. 1-2 Tage alten Ratten wurden 20µl Virussuspension in die linke Hemisphäre injiziert. Das Körpergewicht wurde am Tag 0, 3, 5, 7 und 10 nach Infektion ermittelt.

Folgende Viren zeigten ein neurovirulentes Verhalten: die rekombinanten Viren EdtagCAMHmt1 - EdtagCAMHmt5, CAM/RB und EdtagCAMH, diesen Viren ist der Austausch der Nukleotide im H-Gen an den Positionen 603 und 619 von Adenin zu Guanin gemeinsam.

4.2 Versuche zur Etablierung eines Zellkultursystems, das die Neurovirulenz der unterschiedlichen Viren reflektiert

4.2.1 Vorüberlegungen zur Etablierung eines Systems

Um mehr über die Mechanismen herauszufinden, die für dieses unterschiedliche Neurovirulenzverhalten der Stämme verantwortlich sind, wollten wir ein *in vitro* Zellkultursystem etablieren, welches weitere experimentelle Untersuchungen zulässt. Bei der Pathogenese spielen Faktoren wie die Rezeptorbenutzung, das Bindungsverhalten, die Virusaufnahme, die Replikation und die Virusausbreitung eine Rolle. Ausgangspunkt für die Etablierung eines Zellkultursystems war die Tatsache, dass entsprechende Versuche im Tiermodell schwierig und teilweise gar nicht analysierbar sind. Deshalb wurde nach einer Zelllinie gesucht, mit deren Hilfe man einfache virologische Tests wie Virusinfektionsversuche und Virusbindungsversuche durchführen kann.

4.2.2 Zusammenstellung der getesteten Zellen

In der folgenden Tabelle sind alle Zelllinien bzw. auch die primären Rattenhirnzellen aufgeführt, mit denen die nachfolgenden Untersuchungen durchgeführt wurden.

Tab. 4.8: Zusammenstellung der Zellen mit Art Zelltyp und Anwesenheit von den beiden bekannten humanen MV-Rezeptoren CD46 und SLAM auf der Oberfläche der Zellen.

Spezies	Zelllinie	Zelltyp	CD46	SLAM
Mensch	U251	Astrozytom	ja	nein
	U373	Astroglia	ja	nein
	IMR-32	Neuroblastom	ja	nein
	S-KN-MC	Neuroblastom	ja	nein
	D54	Glioblastom	ja	nein
	HBMEC	Endothel	ja	nein
Maus	NS20Y	Neuroblastom		
	DBT	Astrozytom		
Ratte	C6	Glioblastom		
	PC-12	Neuronenvorläufer		
	gemischte primäre Hirnzellen*	alle		

* Präparation siehe Methoden 3.1.6

4.2.3 Virusbindungsversuche von unterschiedlichen Viren an verschiedenen Zelltypen

Die Arbeitshypothese für diesen Versuch war folgende:

Unter der Annahme, dass die Neurovirulenz der Viren durch die Fähigkeit an einen zellulären Rezeptor binden zu können, vermittelt wird, sollten neurovirulente Viren ein sehr viel besseres Bindungsverhalten zeigen, als nicht neurovirulente Viren.

Um diese Arbeitshypothese zu überprüfen, wurden Virusbindungsversuche mit den verschiedenen neurovirulenten und nicht neurovirulenten Viren an die verschiedenen Zelltypen durchgeführt. In Abb. 4.18 ist ein Beispiel für die Virusbindung von den verschiedenen Viren an die Zelllinie S-KN-MC dargestellt.

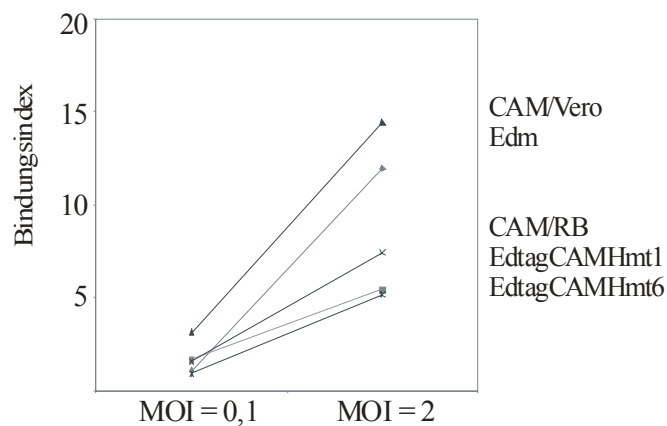


Abb. 4.18: Virusbindungsversuch der verschiedenen neurovirulenten und nicht neurovirulenten Viren hier im Beispiel an SK-N-MC-Zellen.

Fasst man die Ergebnisse der Virusbindungsstudien von den in Tabelle 4.8 beschriebenen Zellen zusammen, so zeigten alle rekombinanten Viren und CAM/RB im Vergleich zu Edm oder dem zellkulturadaptierten Stamm CAM/Vero eine deutlich schwächere Bindung. Bei den rekombinanten Viren konnte kein Unterschied im Bindungsverhalten der neurovirulenten und nicht neurovirulenten Viren beobachtet werden. Ebenso steht das Ergebnis, dass der nicht neurovirulente Stamm CAM/Vero erheblich besser an die Zellen binden kann, als der neurovirulente Stamm CAM/RB im Gegensatz zur Arbeitshypothese, die also auf Grund dieser Daten nicht bestätigt werden konnte.

4.2.4 Infektionsversuche von verschiedenen Zelltypen mit unterschiedlichen Viren

Um einen weiteren Faktor bei der Pathogenese zu betrachten, wurden Infektionsversuche mit den verschiedenen Viren und Zellen durchgeführt. Hierbei sollte die Hypothese überprüft werden, ob die Neurovirulenz der unterschiedlichen Stämme vom Infektionsverhalten der Viren abhängig ist. Es galt zu überprüfen, ob unter dieser Annahme die neurovirulenten Stämme die Zellen sehr viel besser infizieren können als die nicht neurovirulenten Stämme.

Tab. 4.9: Zusammenstellung der Infektionsergebnisse mit den verschiedenen Zelllinien und Viren. Die Zellen wurden mit einer MOI = 0,1 infiziert und nach 5 Tagen für die FACS-Analyse mit dem anti-MV-Antikörper K29 gefärbt, und die Expression des H-Proteins auf der Zelloberfläche detektiert.

	U251	U373	IMR	D54	HBMEC	DBT	C6	PC-12	primäre Zellen
Edm	+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+
CAM/RB	++	+	+	+	+	-	-	-	+++
CAM/Vero	+/+++	+++	+++	+++	+++	-	-	-	+
EdtagCAMHmt1	++	++	++	++	+	-	-	-	+++
EdtagCAMHmt6	+	+	++	++	++	-	-	-	+

+++ = sehr starke Infektion, ++ = starke Infektion, + = schwache Infektion, - = keine Infektion

Alle humanen Hirnzelllinien, die auch alle CD46 auf der Oberfläche exprimieren, konnten mit den verschiedenen Viren infiziert werden. Dabei infizierten die zellkulturadaptierten Stämme Edm und CAM/Vero noch besser als die übrigen. Im Gegensatz dazu stehen die Ergebnisse mit der Mäusezelllinie DBT und den Rattenzelllinien C6 und PC-12, bei diesen Zellen konnte auch nach noch längerer Inkubationszeit mit den Viren keine H-Expression auf den Zellen detektiert werden. Das einzige Zellkultursystem, das sich ähnlich verhielt wie die Infektion *in vivo* waren die primären Ratten-Hirnzellen. Die Infektion der primären Ratten Hirnzellen in Zellkultur mit neurovirulenten MV-Stämmen war signifikant besser, als mit den nicht neurovirulenten Stämmen. Da hier die Infektion ausgezeichnet mit den *in vivo* Daten korreliert, könnten weiterführende Versuche in diesem Zellkultursystem durchgeführt werden.

4.3 Zytokinnachweis in infizierten Rattenhirnen

4.3.1 Grundlagen

Um zu untersuchen, ob durch die Infektion mit den verschiedenen Viren eine unterschiedliche Zytokinexpression in den Gehirnen der infizierten Tiere ausgelöst wird, wurde die Gesamt-RNA aus den sofort nach der Präparation tiefgefrorenen Hirnen isoliert, diese revers transkribiert und als Template mit den jeweiligen Primern in der PCR eingesetzt (siehe Methoden 3.5.4.1, 3.5.5, 3.5.6 und 3.5.7). Besonderes Interesse lag hierbei beim Vergleich der Zytokinexpression von neurovirulenten und nicht neurovirulenten Stämmen.

4.3.2 Ergebnisse der PCR-Analyse zum Zytokinnachweis

Dargestellt sind jeweils die PCR-Amplifikate aller Proben nebeneinander. In den Spuren 1 und 2 der Abb. 4.19a) und b) sind zusätzliche Kontroll-PCRs durchgeführt worden, die bei den Abb. 4.19c) bis l) nicht notwendig waren, deshalb sind hier 33 Spuren anstatt 31 bei den übrigen gezeigt.

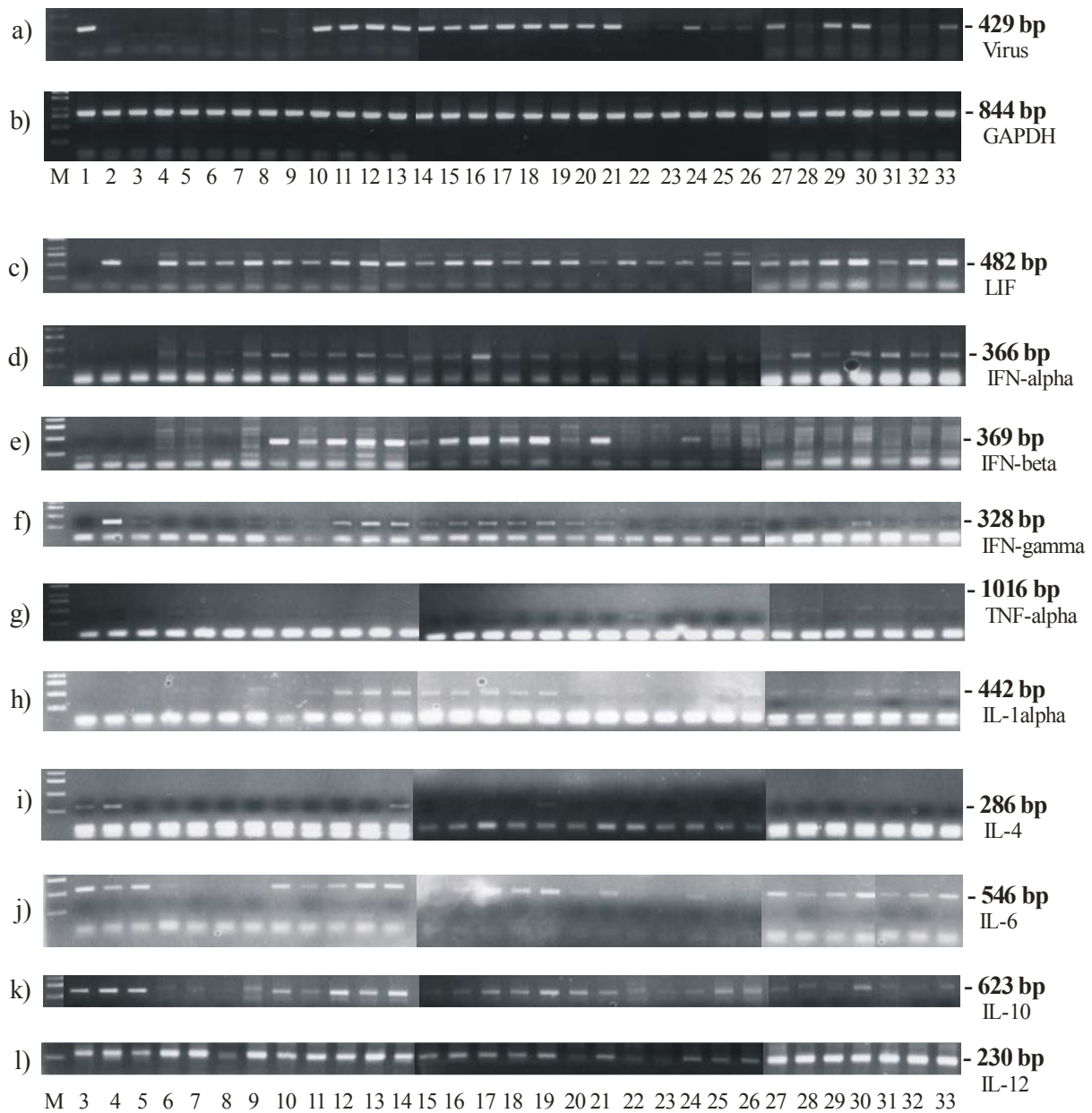


Abb. 4.19: Gegenüberstellung der verschiedenen PCR-Nachweise. Nachweis in Abb.: a) = Virus, mit den universellen Morbillivirus-Primern, zu amplifizierendes Fragment 429bp; b) = PCR-Kontrolle mit Primern, die ein 844bp Fragment von GAPDH amplifizieren; c) = LIF, zu amplifizierendes Fragment 482bp; d) = IFN-alpha, zu amplifizierendes Fragment 366bp; e) = IFN-beta, zu amplifizierendes Fragment 369bp; f) = IFN-gamma, zu amplifizierendes Fragment 328bp; g) = TNF-alpha, zu amplifizierendes Fragment 1016bp; h) = IL-1alpha, zu amplifizierendes Fragment 442bp; i) = IL-4, zu amplifizierendes Fragment 286bp; j) = IL-6, zu amplifizierendes Fragment 546bp; k) = IL-10, zu amplifizierendes Fragment 623bp; l) = IL-12, zu amplifizierendes Fragment 230bp. Spuren 1-33 siehe Tab. 4.10

Tab. 4.10: Diese Tabelle dient als Legende der PCR-Proben, die in der Abb. 4.19 gezeigt sind.

Spur	RNA von	Virus	Tag nach Infektion/ Hirnentnahme
1	Vero-Zellen	EdtagCAMHmt3	3
2	Vero-Zellen	Mock-Kontrolle	3
3	unstim Lewis Milzzellen	kein	
4	ConA stim Lewis Milzzellen	kein	
5	LPS stim Lewis Milzzellen	kein	
6	Lewis Hirn	kein	0
7	Lewis Hirn	kein	3
8	Lewis Hirn	kein	5
9	Lewis Hirn	kein	7
10	Lewis Hirn	CAM/RB	3
11	Lewis Hirn	EdtagCAMH	3
12	Lewis Hirn	EdtagCAMH	5
13	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt1	3
14	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt1	5
15	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt2	3
16	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt2	5
17	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt3	5
18	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt4	3
19	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt4	5
20	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt5	3
21	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt5	5
22	Lewis Hirn	Edtag	3
23	Lewis Hirn	Edtag	5
24	Lewis Hirn	Edtag	7
25	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt6	3
26	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt6	5
27	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt6	7
28	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt14	3
29	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt14	5
30	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt14	7
31	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt15	3
32	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt15	5
33	Lewis Hirn	EdtagCAMHmt15	7

Im Einzelnen ist nun auf den Abbildungen zu erkennen:

Abb. 4.19b) zeigt die GAPDH-Kontrollansätze für alle durchgeführten PCRs und dient dazu, zu zeigen dass bei allen PCR-Ansätzen dieselben cDNA Mengen zur Amplifikation verwendet wurden.

Der Infektionsnachweis mit den universellen Morbillivirus-Primern in Abb. 4.19a) zeigt, dass bei allen Tieren, die mit Virus infiziert wurden, auch Virus vorhanden war, es wurde jedem Tier (außer den Kontroll-Tieren) am Tag 0 ca. $1-2 \times 10^4$ Viren injiziert. Allerdings weisen die mit nicht neurovirulenten Viren (Spuren 22 – 33) infizierten Tiere schwächere Banden auf,

die mit zunehmender Infektionsdauer intensiver werden. Die Bandenintensität der mit neurovirulenten Viren infizierten Tiere ist gleich stark auch schon nach kürzerer Infektionsdauer.

Abb. 4.19c) zeigt den Nachweis von LIF, es wurde in jedem Hirn gleich exprimiert, egal ob infiziert oder uninfiziert und es können keine Unterschiede zwischen neurovirulenten und nicht neurovirulenten Viren beobachtet werden.

Abb. 4.19d) zeigt die IFN-alpha Expression, es wird in allen Ratten Hirnen exprimiert egal ob infiziert oder uninfiziert. Die Bandenintensität ist nicht sehr stark.

In Abb. 4.19e) ist der Nachweis von IFN-beta dargestellt, deutliche Banden sind nur bei mit neurovirulenten Viren infizierten Tieren zu erkennen. Außer beim Virus Edtag, dort konnte nach 7 Tagen der Infektion eine schwache IFN-beta spezifische Bande detektiert werden.

Abb. 4.19f) zeigt den Nachweis von IFN-gamma, es sind schwache aber deutlich sichtbare Banden bei mit neurovirulenten Viren infizierten Tieren erkennbar. Aus den mit nicht neurovirulenten Viren infizierten Hirnen konnte nur eine sehr schwache Expression nachgewiesen werden.

Abb. 4.19g) zeigt den Nachweis von TNF-alpha, wobei aber der PCR-Nachweis bei allen Proben negativ verlaufen ist, es konnte kein TNF-alpha spezifisches Fragment amplifiziert werden.

Abb. 4.19h) zeigt die Amplifikate zum Nachweis von IL-1alpha. Es wird in allen infizierten Hirnen exprimiert, wobei in den Spuren 12 bis 19 (neurovirulente rekombinante Viren) starke Signale zu sehen sind.

Abb. 4.19i) stellt die Amplifikation zum Nachweis von IL-4 dar. Die Zusammenstellung zeigt nur 2 sehr schwache Banden von Tieren, die mit EdtagCAMHmt1 und mt4 infiziert wurden und deren Gehirne nach 5 Tagen Infektionsdauer entnommen wurden.

In Abb. 4.19j) ist der Nachweis von IL-6 gezeigt, dieses Zytokin konnte in allen infizierten Hirnen nachgewiesen werden, auch konnte wieder ein Anstieg der Bandenintensität mit Zunahme der Infektionsdauer beobachtet werden.

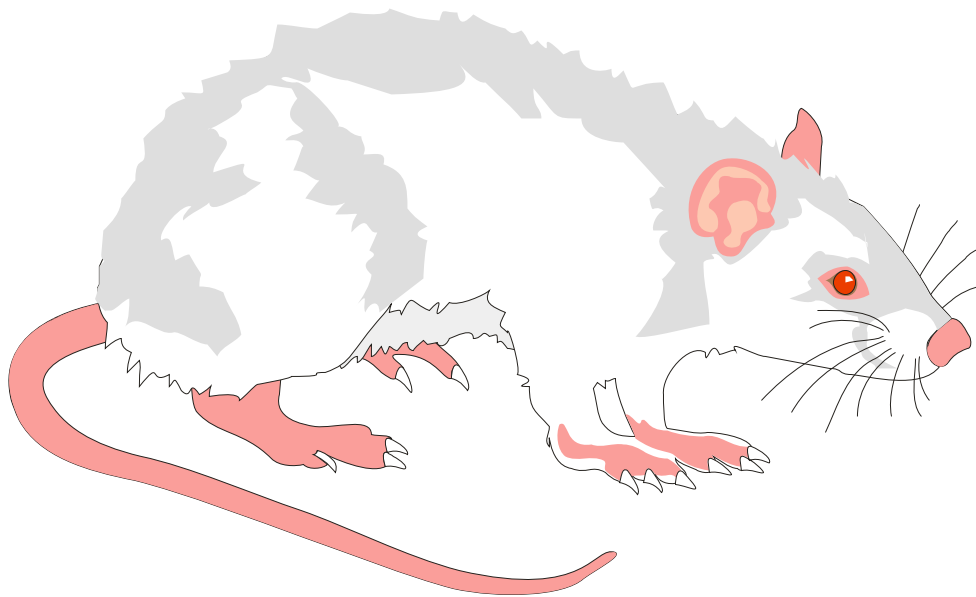
Abb. 4.19k) zeigt die Amplifikate von IL-10, es konnte auch bei allen infizierten Hirnen nachgewiesen werden und es ist ein Anstieg der Bandenintensität mit Zunahme der Infektionsdauer festzustellen.

Abb. 4.19l) zeigt den Nachweis vom Zytokin IL-12, es wurde in allen Hirnen exprimiert, egal ob infiziert oder uninfiziert und es können keine Unterschiede zwischen mit neurovirulenten und nicht neurovirulenten Virusstämmen infizierten Tieren gemacht werden.

4.4 CD46 transgene Lewis-Ratten

4.4.1 Rückkreuzen der transgenen Ratten auf Lewis-Ratten

Um den Einfluss des transgenen CD46 Proteins in dem ZNS Tiermodell der Lewis-Ratte zu untersuchen wurden diese Sprague-Dawley-Ratten auf den genetischen Hintergrund der Lewis-Ratten zurückgekreuzt. Per Definition wird derjenige als Inzuchtstamm bezeichnet, der in mindestens 20 Generationen in ununterbrochener Folge in Bruder/Schwester Verpaarung geführt wird.



4.4.2 PCR-Analyse zum Nachweis von CD46

Zuerst wurde per PCR-Analyse getestet ob das transgene CD46-Gen auch in allen Geweben der rückgekreuzten Tiere vorhanden ist. Wie in Abb. 4.20 zu sehen ist, konnten bei den Lewis-Ratten mit den spezifischen CD46 Primern kein Fragment amplifiziert werden. Nur die Kontrollen mit HeLa und menschl. PBL ergeben ein Amplifikat mit der Größe von 350bp.

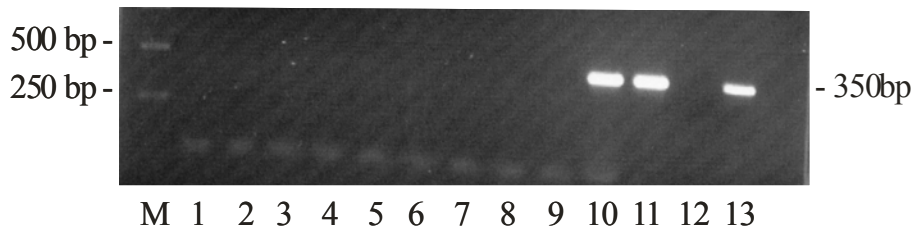


Abb. 4.20: PCR von verschiedenen Geweben einer Lewis-Ratte und humaner Zellen. 1 = Hirn, 2 = Herz, 3 = Leber, 4 = Muskel, 5 = Niere, 6 = Haut, 7 = Milz, 8 = Lunge, 9 = Darm, 10 = hum. PBL, 11 = HeLa-Zellen, 12 = negativ Kontrolle, 13 = HeLa-Zellen.

In Abb. 4.21 ist das PCR-Ergebnis von den transgenen Geweben gezeigt. Es konnte in allen Geweben CD46 nachgewiesen werden. Die geringere Bandenintensität bei Probe Nr. 6 und Nr.8 liegt an der geringer eingesetzten Template-DNA. Die Fragmentgrößen von 350bp entsprechen der erwarteten Größe.

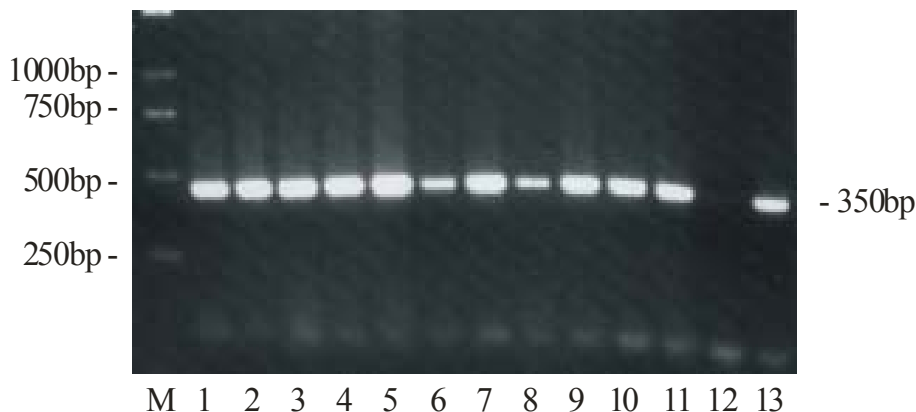


Abb. 4.21: PCR von verschiedenen Geweben einer transgenen Lewis-Ratte. 1 = Hirn, 2 = Herz, 3 = Leber, 4 = Muskel, 5 = Niere, 6 = Haut, 7 = Milz, 8 = Lunge, 9 = Darm, 10 = hum. PBL, 11 = HeLa-Zellen, 12 = negativ Kontrolle, 13 = HeLa-Zellen.

4.4.3 Western-Blot-Analyse zum Nachweis von CD46

Um die unterschiedliche Expressionsform des CD46 je nach Gewebetyp, wie es auch für den Menschen beschrieben worden ist, in den Ratten nachzuweisen, wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt.

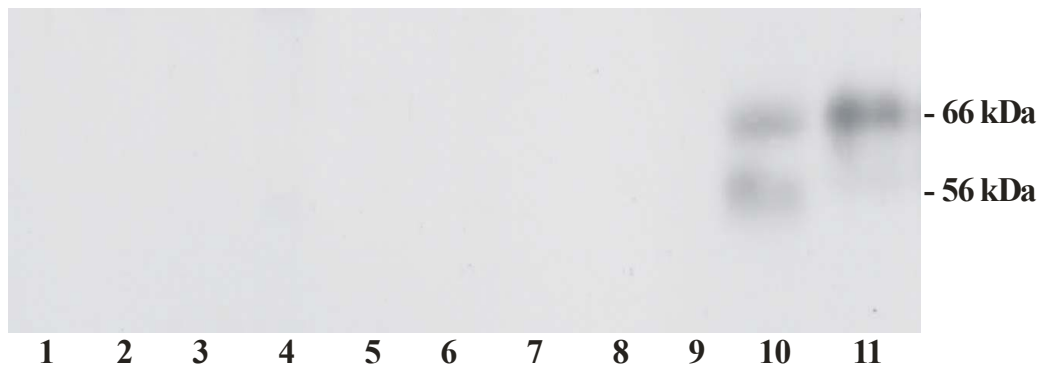


Abb. 4.22: Western-Blot von verschiedenen Geweben einer Lewis-Ratte. 1 = Haut, 2 = Leber, 3 = Niere, 4 = Milz, 5 = Lunge, 6 = Darm, 7 = Herz, 8 = Hirn, 9 = Muskel, 10 = HeLa-Zellen, 11 = hum PBL.

In keinem Gewebetyp der normalen Lewis-Ratte konnte CD46 nachgewiesen werden.

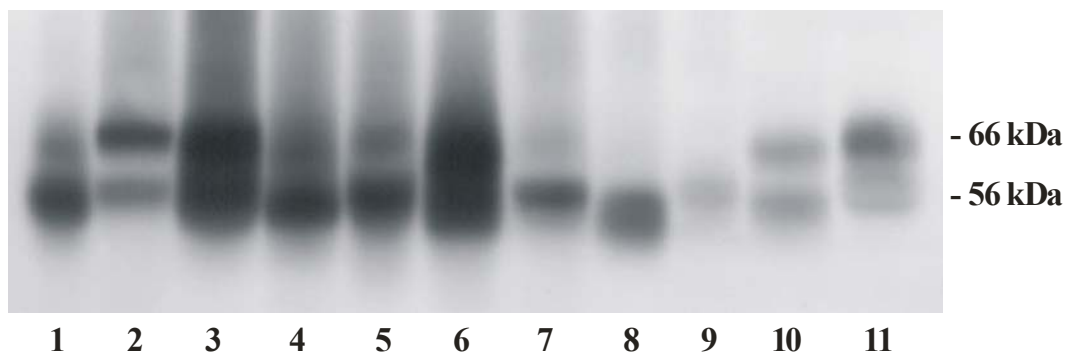


Abb. 4.23: Western-Blot von verschiedenen Geweben einer transgenen Lewis-Ratte. 1 = Haut, 2 = Leber, 3 = Niere, 4 = Milz, 5 = Lunge, 6 = Darm, 7 = Herz, 8 = Hirn, 9 = Muskel, 10 = HeLa-Zellen, 11 = hum PBL.

In Abb. 4.23 ist zu erkennen, dass die gewebsspezifische Expression von CD46 in den rückgekreuzten Tieren mit der Expression im Menschen (Johnstone *et al.*, 1993) übereinstimmt. So wird im Gehirn ausschließlich die 56kDa Spleißform exprimiert, wohingegen in den anderen Geweben meist (vergleiche Spur 7) beide Formen exprimiert werden können.

4.4.4 FACS-Analyse zum Nachweis von CD46

In Abb. 4.24 ist die CD46 Expression auf der Zelloberfläche von Milzzellen transgener und normaler Lewis-Ratten und von Kontrollzellen dargestellt.

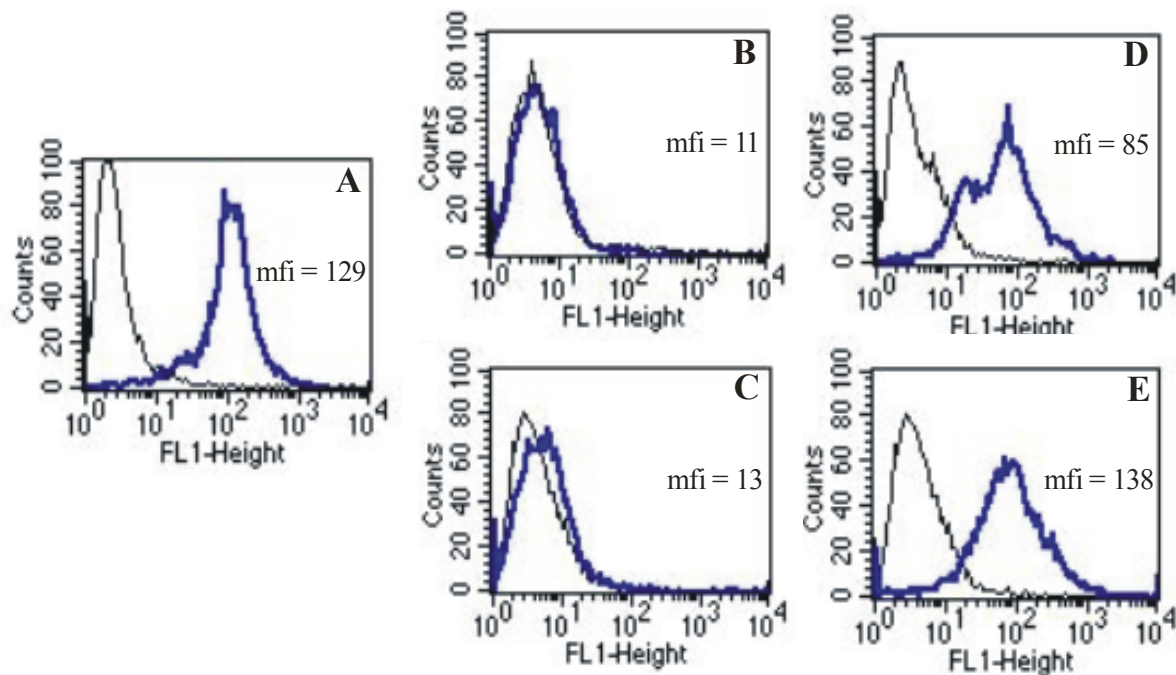


Abb. 4.24: FACS-Kurven zur CD46 Expression auf der Zelloberfläche von den verschiedenen Zellen. In Abbildung A sind als positiv Kontrolle BJAB-Zellen gefärbt. B zeigt unstimulierte Milzzellen normaler Lewis-Ratten. In Abb. C sind mit ConA stimulierte normale Ratten Milzzellen. D zeigt die Expression von CD46 auf unstimulierten CD46 transgenen Milzzellen. E zeigt die CD46 Expression auf mit ConA stimulierten transgenen Milzzellen. Die blauen Kurven zeigen die CD46 Expression an, die schwarzen Kurven zeigen die Kontrollversuche mit jeweils nur dem Sekundärantikörper.

Wie man anhand der Abbildung 4.24 sehen kann, ist eine starke CD46 Expression auf den Milzzellen der transgenen Ratten zu detektieren, sowohl schon bei unstimulierten und noch etwas stärker bei ConA stimulierten Zellen. Bei unstimulierten und auch bei stimulierten normalen Lewis Milzzellen ist mit den verwendeten spezifischen Antikörpern kein CD46 nachweisbar.

4.4.5 Infektionsversuche *in vitro* mit Milzzellen

Um zu untersuchen, ob die Expression des humanen CD46 auf der Zelloberfläche der transgenen Lewis-Ratten die Infektion der Milzzellen ermöglicht, wurden Infektionsversuche mit den verschiedenen Viren durchgeführt.

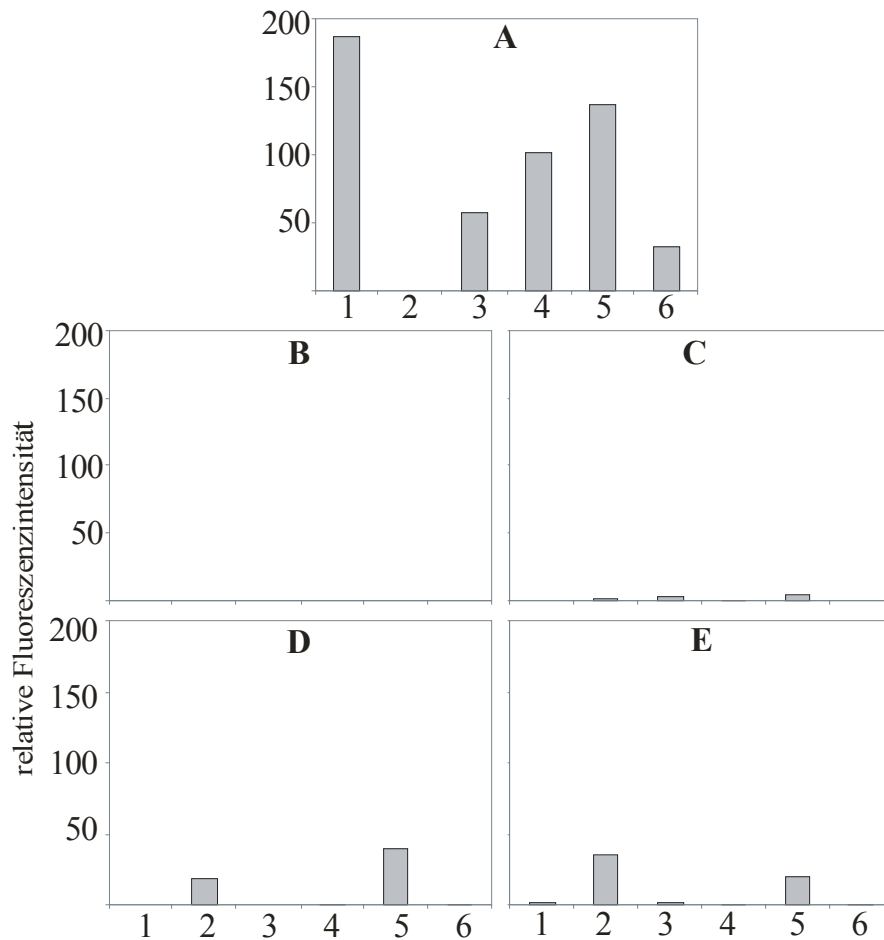


Abb. 4.25: Virusinfektionsversuch von stimulierten und unstimulierten Milzzellen. In Abbildung A sind Vero-Zellen als Kontrolle mit den verschiedenen Viren infiziert worden (1 = Edm, 2= WTFb, 3 = CAM/RB, 4 = CAM/Vero, 5 = EdtagCAMHmt1, 6 = EdtagCAMHmt6). Abbildung B sind unstimulierte Lewis Milzzellen, Abb. C sind stimulierte Lewis Milzzellen. Abbildung D sind unstimulierte transgene Milzzellen und Abb. E sind mit ConA stimulierte transgene Milzzellen.

Das Ergebnis ist in Abb. 4.25 zu sehen. Vero-Zellen wurden bei diesem Versuch mit den verschiedenen Viren zur Kontrolle infiziert und die Zellen zeigten eine Expression der Virus H-Proteine auf der Oberfläche, außer Virus Wildtypstamm WTFb, der Vero-Zellen nicht infizieren konnte. Die Milzzellen sowohl unstimuliert als auch mit ConA stimuliert zeigen gar keine bzw. bei den stimulierten Milzzellen der normalen Lewis-Ratten eine minimale, jedoch nicht signifikante Expression des MV-H-Proteins. Bei den Milzzellen der transgenen Tiere konnte eine geringe Expression der Virus H-Proteine der Stämme WTFb und

EdtagCAMHmt1 bei unstimulierten Zellen detektiert werden. Bei den mit ConA stimulierten Milzzellen ist die Expression vom Hämagglutinin des WTFb-Stammes etwas stärker. Die Expression vom EdtagCAMHmt1 ist etwas geringer als bei unstimulierten Zellen. Außerdem kann zusätzlich eine sehr geringe Expression des H-Proteins von Edm und CAM/RB detektiert werden. Aber die Expression der H-Proteine der Viren ist bei den CD46 transgenen Zellen sehr viel geringer als bei den Vero-Kontrollzellen.

4.4.6 Infektionsversuche *in vivo*

Die CD46 transgenen Ratten wurden im Tierexperiment auf Infizierbarkeit mit Masernviren getestet. In Abb. 4.26 sind die Gewichtsverläufe der mit den verschiedenen Viren infizierten Tiere zu sehen.

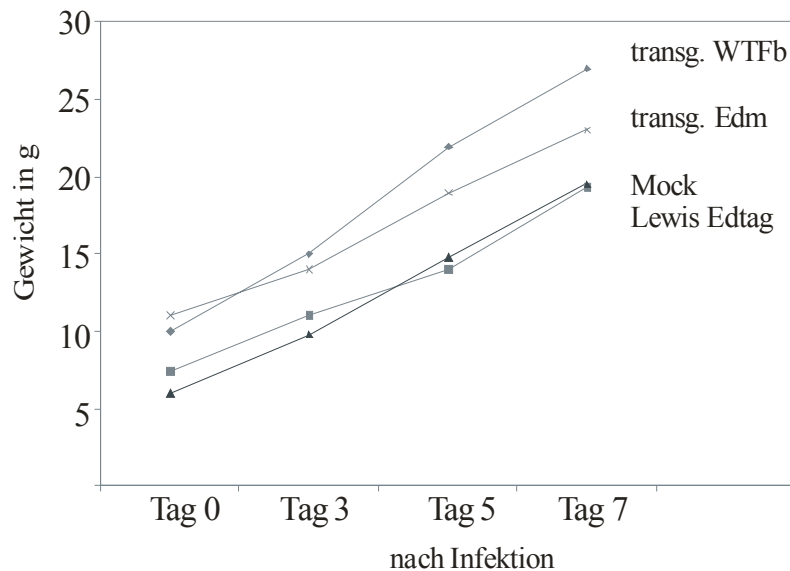


Abb. 4.26: Gewichtsverlauf transgener und normaler Lewis-Ratten. Analyse des Körpergewichtes von i.c. infizierten Ratten. 1-2 Tage alten Ratten wurden 20µl Virussuspension (entspricht ca. 1×10^4 pfu; Edm und WTFb bei transgenen Ratten und Edtag bei normalen Ratten) in die linke Hemisphäre injiziert. Das Körpergewicht wurde am Tag 0, 3, 5 und 7 nach Infektion ermittelt.

Die getesteten Viren haben sich in den transgenen Ratten nicht anders als in den normalen Lewis-Ratten verhalten. Es gab keine Anzeichen dafür, dass die CD46-Expression auf den Zellen transgener Ratten den Viren zur Infektiosität verhilft.

5 Diskussion

Die Hauptaufgabe dieser Arbeit war die funktionelle Charakterisierung der einzelnen Mutationen im Hämagglutininprotein, die in der Veröffentlichung von Liebert *et al.*, 1994 beschrieben worden sind, im Hinblick auf Antikörperescape und Neurovirulenz mittels rekombinanter MV. Nach der genauen und ausführlichen Charakterisierung der Mutationen in dem MV-Hüllprotein, sollten auch noch Informationen über die Mechanismen gewonnen werden, die für dieses unterschiedliche Neurovirulenzverhalten der MV-Stämme verantwortlich sind. Bei der Pathogenese spielen die Hüllproteine des MV für die Rezeptorbenutzung, das Bindungsverhalten, die Virusaufnahme, die Replikation und schließlich die Virusausbreitung eine wichtige Rolle. In diesem Zusammenhang wurde auch der Einfluss der CD46-Expression, als ein MV-Rezeptor, der von Edm sowie von den von CAM abgeleiteten MV-Stämmen benutzt wird, bei transgenen Lewis-Ratten untersucht.

5.1 Charakterisierung der Mutationen im MV-H-Gen

Die Interaktion von viralen Hüllproteinen mit zellulären Rezeptoren ist nicht nur eine Voraussetzung für die Virus-Aufnahme, sondern hat auch großen Einfluss auf die Pathogenese von virus-induzierten Erkrankungen (Schneider-Schaulies, 2000). Anhand einzelner Aminosäureaustausche in den Hüllproteinen verschiedener Viren, einschließlich Mumps (Kövamees *et al.*, 1990) und MV (Liebert *et al.*, 1994), konnten tief greifende und unterschiedliche Einflüsse auf die Pathogenese beobachtet werden. Veränderungen in den viralen Hüllproteinen können eine Reihe von verschiedenen pathogenen Folgeerscheinungen haben: Einzelmutationen beeinflussen die Neuroinvasivität von Tick-Borne-Encephalitis-Virus (Holzmann *et al.*, 1997, Stiasny *et al.*, 1996; Rey *et al.*, 1995), die Neurovirulenz von Denguevirus (Hiramatsu *et al.*, 1996) und Japanisches-Encephalitis-Virus (Ni und Barrett,

1998), die virale Persistenz im Falle vom Lymphocytären-Choriomeningitis-Virus (Matloubian *et al.*, 1990), die Zell-zu-Zell Ausbreitung bei Rabiesvirus (Dietzschold *et al.*, 1985; Seif *et al.*, 1985) und schließlich die Virus Replikationseffizienz bei Sindbisvirus (Dropulic *et al.*, 1997).

Durch die Verwendung von rekombinanten MV mit einem ausgetauschten H-Protein konnte früher schon gezeigt werden, dass der Austausch des H-Proteins vom Edmonston-Stamm gegen das H-Protein vom CAM/RB-Stamm genügt, um ein verändertes Neurovirulenzverhalten in Mäusen auszulösen (Duprex *et al.*, 1999). Wie in der vorliegenden Arbeit beschrieben ist, gilt das entsprechende für die intracerebrale Infektion von neugeborenen Lewis-Ratten. Alleine das H-Protein des CAM/RB Stammes reicht aus, um die Neurovirulenz von rekombinanten MV, die auf dem nicht neurovirulenten Hintergrund des Edmonston-Stammes basieren, zu vermitteln. Die genaue Funktion jedes einzelnen Aminosäureaustausches im H-Protein auf den Antikörperescape oder die Neurovirulenz konnte früher noch nicht untersucht werden, da die Mutationen nur in Kombination aufgetreten sind, und die Technik zur Herstellung von rekombinanten MV erstmals 1995 von Radecke *et al.* etabliert und beschrieben wurde. Vorher konnte auch nicht ausgeschlossen werden, dass die Neurovirulenz möglicherweise nur durch andere Gene vermittelt wird (Liebert *et al.*, 1994).

Neben dem MV-H müssen andere Gene nach meinen Ergebnissen tatsächlich auch noch einen gewissen Einfluss auf die Neurovirulenz haben, da CAM/RB immer noch etwas virulenter ist als das rekombinante MV EdtagCAMH (Duprex *et al.*, 1999; Moeller *et al.*, 2001). So könnte z.B. das Matrixprotein einen Einfluss ausüben. Die Interaktion vom MV-H-Protein mit dem Matrix-Fusionskomplex kann die Virusausbreitung beeinflussen (Cathomen *et al.*, 1998a und b). Anhand einer infektiösen MV-Matrixdeletions-Mutante konnte die bessere fusogene Kapazität im Vergleich zum normalen Virus gezeigt werden, und diese Mutante kann tiefer ins Gehirnparenchym von infizierten Mäusen vordringen (Cathomen *et al.*, 1998a). Ähnliche Ergebnisse, die die Virusausbreitung betreffen, konnten mit rekombinanten Viren beobachtet werden, denen der cytoplasmatische Bereich des Fusions- oder des Hämagglutinin-Proteins fehlt, was anzeigt, dass die Interaktion des M-Proteins mit den cytoplasmatischen Bereichen dieser Proteine bei der Regulation der virus-induzierten Zellfusion beteiligt sind (Cathomen *et al.*, 1998b). Interessanterweise wurden Mutationen im Matrix-Protein und im

Diejenigen Mutationen die für die Antikörperbindung bzw. den Escape verantwortlich sind, was die FACS-Ergebnisse mit den rekombinanten Viren aus den Versuchen (Abb. 4.2, Abb. 4.4 und Abb. 4.16) zeigen, befinden sich im oberen Teil des Langedijk-Modells, den so genannten Propellern. Dieser Teil des Moleküls wird dafür verantwortlich gemacht, nicht nur mit den neutralisierenden Antikörpern (Gerlier *et al.*, 1995; Hummel und Bellini, 1995; Patterson *et al.*, 1999) sondern auch mit den zellulären Rezeptoren für MV, CD46 (Dörig *et al.*, 1993; Naniche *et al.*, 1993) und SLAM (Erlenhoefler *et al.*, 2001; Hsu *et al.*, 2001; Tatsuo *et al.*, 2000) zu interagieren. Weil die Mutationen, die für den Escape verantwortlich sind, nicht die Replikation der einzelnen Viren in Vero-Zellen beeinflussen, scheint die Interaktion mit dem Rezeptor CD46 nicht verändert zu sein.

Im Gegensatz zu den Mutationen, die den Antikörperescape vermitteln, sind die Mutationen, die mit der Neurovirulenz assoziiert sind, was durch die entsprechenden Tierversuche (Abb. 4.3, Abb. 4.5, Abb. 4.6, Abb. 4.7, Abb. 4.15 und Abb. 4.17) ermittelt wurde, im Stamm2-Bereich des MV-H-Proteins angesiedelt. Dabei war ein weiteres wichtiges Ergebnis meiner Arbeit, dass die beiden Mutationen an den Aminosäurestellen 195 und 200 nur in Kombination als Glycin und Serin das Virus neurovirulent machen. Von der Oberfläche dieses Stamm2-Bereiches wird angenommen, dass sie parallel zur vertikalen Achse des H-Moleküls verläuft und die Interaktion vom Hämagglutininprotein mit Molekülen in derselben Membran begünstigt (also z.B. dem F-Protein). Es ist noch nicht klar, welche strukturelle Folge die Mutation an Position 195 (der Austausch von Arginin zu Glycin bei neurovirulenten Stämmen) haben könnte, außer dass eine positive Ladung auf der Oberfläche des Moleküls entfernt wird, was veränderte Bindungs- und Faltungseigenschaften des Proteins zur Folge haben könnte. Der Austausch an Position 200 (von Asparagin zu Serin bei neurovirulenten Stämmen) führt zum Verlust einer benutzten Glykosylierungsstelle im H-Protein neurovirulenter Stämme (Abb. 4.9, Abb. 4.10, Abb. 4.11 und Abb. 4.14). Der Verlust dieser Glykosylierungsstelle im H-Protein könnte eine strukturelle Veränderung bewirken, oder zur Freilegung von Bindungsstellen führen, die die Neurovirulenz vermitteln können.

5.2 Mögliche Struktur-Funktionbeziehungen der Mutationen

Von Seiten der nicht neurovirulenten Viren ausgehend betrachtet, könnte die Generierung und Benutzung dieser neuen Glykosylierungsstelle und die zusätzliche Ladungsveränderung bewirken, dass eine veränderte Oberflächenstruktur hergestellt wird und dadurch Bindungsstellen, die im Nagerhirn für die Virusausbreitung notwendig sein könnten, blockiert werden. Diese strukturelle Veränderung könnte die Interaktion mit einem unbekanntem zellulären Bindungsrezeptor in der Ratte oder die Fusionshelferfunktion vom H-Protein, und dieses die Virusaufnahme oder die Zell-zu-Zell Ausbreitung, beeinflussen.

Aufgrund des sehr ähnlichen Wachstumsverhaltens (Versuch 4.1.15) der verschiedenen neurovirulenten und nicht neurovirulenten Stämme in Vero-Zellen, kann in der Zellkultur kein Unterschied festgestellt werden, der den Einfluss der Glykosylierungsstelle und der Ladungsveränderung auf Virusbindung oder die Ausbreitung der unterschiedlichen Viren erklären könnte. Die Benutzung von CD46 als Rezeptor scheint in der Zellkultur durch den Wegfall der Glykosylierungsstelle und der positiven Ladung bei neurovirulenten Stämmen nicht beeinträchtigt zu sein. Die Infektionsversuche (4.2.4) mit den verschiedenen humanen Hirnzelllinien deuten auch darauf hin, dass die CD46 Benutzung durch diese beiden Veränderungen nicht beeinträchtigt wird. Die Ergebnisse mit den primären Ratten-Hirnzellen, die kein CD46 haben, zeigen jedoch, dass es einen Unterschied der neurovirulenten und nicht neurovirulenten Viren bei der Infizierbarkeit dieser Zellen gibt, was auch mit den *in vivo* Daten korreliert. Die histologische Analyse von unterschiedlich infizierten Rattenhirnen (Abb. 5.2) zeigt die Infektion und die Virusausbreitung in Neuronen. Aufgrund der PCR-Analysen (Abb. 4.19a) wurde auch deutlich, dass die neurovirulenten Viren in den Hirnen effizient replizieren können. Dies spricht dafür, dass es bei den Rattenneuronen einen weiteren Rezeptor geben könnte, mit dem die neurovirulenten Viren bzw. viralen Hüllproteine auf der Oberfläche infizierter Neuronen aufgrund der fehlenden Glykosylierungsstelle interagieren können, die nicht neurovirulenten Viren aber nicht.

Die Sequenzanalyse der H-Gene der natürlichen Escape-Varianten von Liebert *et al.*, (1994) zeigte Austausch an den Aminosäurepositionen 195 und 200 bei allen Varianten, bei neurovirulenten, sowie bei nicht neurovirulenten (Tab. 4.1). Deshalb wurden anfänglich diese Mutationen nicht für entscheidend am unterschiedlichen Neurovirulenzverhalten dieser Stämme gehalten. Da aber diese Stämme auf Vero-Zellen gezüchtet und passagiert wurden, bevor RNA zur Sequenzierung gewonnen wurde, könnten Mutationen während der Passage in

Zellkultur als Anpassung generiert worden sein. Es ist bekannt, dass der CAM/RB-Stamm seine Neurovirulenz verliert, wenn er einige Male in Zellkultur passagiert wurde. Diese Beobachtung, dass der nicht neurovirulente CAM/Vero-Stamm, der nur über Vero-Zellen gezogen wird, nur diese zwei Mutationen im gesamten H-Gen im Vergleich zum nagerhirnadaptierten CAM/RB-Stamm trägt (vergl. Versuche 4.1.11 und 4.1.12), untermauert die Vermutung, dass diese Mutationen durch die Passage in Vero-Zellen generiert wurden. Diese anhand der rekombinanten Viren erzielten Daten zeigen, dass der Unterschied der Neurovirulenz von den natürlichen von Liebert beschriebenen Escape-Mutanten offensichtlich nicht durch die Antikörper generiert wurde, die zur Selektion dieser Stämme eingesetzt wurden, sondern eine Folge der notwendigen Propagierung dieser Viren in Zellkultur ist. Ähnliche Resultate wurden mit dem Louping-ill-Virus erzielt, bei dem durch die Zucht der Viren in Anwesenheit von einem neutralisierenden Antikörpern eine Mutation im Hüllprotein generiert wurde, die zur Entstehung einer potentiellen Glykosylierungsstelle und zum Verlust der Neurovirulenz in Mäusen führte (Jiang *et al.*, 1993). Es geht aber auch aus dieser Veröffentlichung nicht eindeutig hervor, ob die Mutationen nun direkt durch den Selektionsdruck der Antikörper oder durch die Zellkulturpassagierung hervorgerufen wurden.

Auf der Basis des rekombinanten Virus EdtagCAMH, welches neurovirulent ist, und Rekombinante 6, welches nicht neurovirulent ist, wurde deutlich, dass die zwei Mutationen der einzige Unterschied zwischen den unterschiedlich virulenten Rekombinanten sind und dass der Antikörperescape und die Neurovirulenz nicht assoziiert sind. Es stellte sich daher die Frage, welche der beiden Mutationen, ob die an der Stelle 195, mit einer möglichen Veränderung des Ladungszustandes des Moleküls oder die an Position 200 mit Verlust der Glykosylierungsstelle, verantwortlich ist für die Neurovirulenz, oder ob beide Mutationen gleichzeitig auftreten müssen. In Analogie zu den Ergebnissen mit dem Louping-ill-Virus, bei dem durch einen Aminosäureaustausch im Hüllprotein eine potentielle Glykosylierungsstelle entstanden war und diese Mutanten nicht länger ein neurovirulentes Verhalten bei Mäusen zeigten (Jiang *et al.*, 1993), lag die Vermutung nahe, dass auch bei den untersuchten MV-Mutanten die Glykosylierungsstelle die einzige und entscheidende Rolle spielt.

Die Asparagin-verknüpfte Glykosylierung (N-Glykosylierung) ist eine der häufigsten post-translationalen Modifikationen von Proteinen im exozytotischen Signalweg eukaryotischer Zellen. Die Verknüpfung von Oligosacchariden beginnt im endoplasmatischen Retikulum (ER), wenn die Zielsequenz Asn - X - Ser/Thr (wobei X eine beliebige Aminosäure sein

kann) im Lumen des ER erkannt wird (Kornfeld *et al.*, 1985). Nach der Prozessierung des Proteins im ER beginnt unmittelbar die Addition von den Oligosacchariden und während des Transports im Golgi-Apparat wird die Prozessierung vervollständigt. Es werden zwei Hauptklassen von Seitenketten hergestellt: Ketten vom "high"-Mannose Typ, die nur die Zuckerreste enthalten, die im ER angeheftet wurden, und komplexe Ketten, die durch weitere Prozessierung und Addition im Golgi-Komplex entstanden sind. Eine Vielzahl von Funktionen von N-verknüpften Oligosacchariden wurde beschrieben (Rademacher *et al.*, 1988). Oligosaccharide an Glykoproteinen spielen eine Rolle bei der Initiation und Erhaltung der Faltung in die biologisch aktive Konformation, bei der Proteinstabilität und Löslichkeit, beim Schutz des Proteins vor Degradation, bei der Sortierung im Golgi-Apparat zum Zielort, bei der Unterstützung von spezifischer Adhäsion an Zellen und bei der Beeinflussung der Antigenität und Immunogenität des Glykoproteins.

Beim MV gibt es im H-Protein sechs potentielle Glykosylierungsstellen an den Positionen 149, 168, 187, 200, 215 und 238. Die jeweilige Funktion der Glykosylierungsstelle wurde in Bezug auf die Prozessierung und Antigenität des Edm-Stammes mit Hilfe von Mutanten untersucht (Hu *et al.*, 1994). Für Masern wurde bisher kein Zusammenhang von Glykosylierung und Neurovirulenz beschrieben, aber es gibt Untersuchungen beim Cas-Br-E (Wildmaus Retrovirus) Hüllprotein, wobei eine unterschiedliche Glykosylierung mit einer spongiformen Neurodegeneration assoziiert ist (Lynch *et al.*, 2000). Am Beispiel des Gelbfieber-Virus wurde gezeigt, dass der Verlust von Glykosylierungsstellen im NS1-Protein, zur Herabsetzung der Neurovirulenz in Mäusen nach intracerebraler Infektion führte (Muylaert *et al.*, 1996). Es wurde auch der Einfluss der Glykosylierung vom Influenza A Hämagglutinin auf die Neurovirulenz in Mäusen beschrieben (Li *et al.*, 1993; Ward, 1996). Die Expression des glykosylierten gag-Proteins vom murinen Leukämie Virus (MuLV) vermittelt Neurovirulenz (Portis *et al.*, 1994; Portis *et al.*, 1996; Fujisawa *et al.*, 1998). Untersuchungen und Vergleiche der Glykoproteine und deren Glykosylierungen des Chage Valey Virus (CCV) - aus der Familie der Bunyaviren, deuten ebenfalls auf einen Zusammenhang der Glykosylierung mit Neurovirulenz und Pathogenität hin (Brockus *et al.*, 1999). Glykosylierungsmutanten des Maus-adaptierten Dengue Typ 4 Virus wurden ebenfalls in Hinblick auf ihr neurovirulentes Verhalten analysiert (Kawano *et al.*, 1993).

In meiner Arbeit konnte jedoch anhand der Einzelmutanten (EdtagCAMHmt14 und EdtagCAMHmt15) in dem Versuch 4.1.17 gezeigt werden, dass die beiden Mutationen in

Kombination auftreten müssen, damit die Viren ein neurovirulentes Verhalten zeigen. Die Neurovirulenz ist also nicht nur vom Verlust der Glykosylierungsstelle durch den Aminosäureaustausch von Asparagin zu Serin an der Stelle 200 abhängig, sondern erst der gleichzeitige Austausch der Aminosäure Arginin zu Glycin bei neurovirulenten Stämmen an Position 195, was möglicherweise einen Ladungsunterschied an der Oberfläche des Moleküls bewirkt, führt zum neurovirulenten Verhalten. Das Ergebnis aus dem Versuch 4.1.15, dass die Einzelmutante (EdtagCAMHmt14) ein ähnliches Wachstumsverhalten wie die anderen neurovirulenten und nicht neurovirulenten Rekombinanten in Vero-Zellen zeigten, belegt, dass die Virusaufnahme und die Virusweitergabe von Zelle zu Zelle durch den Verlust der Glykosylierungsstelle in Zellkultur nicht beeinflusst wird.

5.3 Die Etablierung eines Zellkultursystems

Um mehr über die Mechanismen herauszufinden, die für das unterschiedliche Neurovirulenzverhalten der MV-Stämme verantwortlich sind, sollte ein *in vitro* Zellkultursystem etabliert werden, welches experimentelle Untersuchungen mit virologischen Tests erlaubt, da die Faktoren, die für die Pathogenese eine Rolle spielen, wie Rezeptorbenutzung, Bindungsverhalten, Virusaufnahme, Replikation und Virusausbreitung, *in vivo* nicht getrennt voneinander beobachtet werden können. In dieser Arbeit wurden Infektionsversuche und Virusbindungsversuche mit verschiedenen Zellen unterschiedlichen Zelltypes durchgeführt (siehe Tab. 4.8). Diesen zwei Versuchsreihen lagen folgende Arbeitshypothesen zugrunde: falls die Neurovirulenz 1.) von der Bindung der Viren an Rezeptoren verantwortlich ist, dann sollten die neurovirulenten Viren besser an die Zellen binden können als die nicht neurovirulenten Viren. Sollte die Neurovirulenz 2.) von der Virus-Zell-Fusion oder Zell-Zell-Fusion abhängen, dann sollten die neurovirulenten Viren die Kulturen besser und schneller infizieren können und die Ausbreitung von Zelle zu Zelle sollte in der Zellkultur auch durch die Ausbildung großer Synzytien sichtbar sein, wie bei der Infektion von Vero-Zellen mit Edm. Sollte die Neurovirulenz 3.) von intrazellulären Faktoren abhängen, dann sollte man mehr infektiöse Viren nachweisen können.

Die Zusammenfassung und Gegenüberstellung der Ergebnisse aller Virusbindungsversuche (als Beispiel Abb. 4.18) zeigte, dass generell die Bindung von den zellkulturadaptierten Viren Edm und CAM/Vero besser war, als die Bindung der rekombinanten Viren oder des

nagerhirnadaptierten CAM/RB-Stammes. Die Arbeitshypothese konnte nicht bestätigt werden, es zeigte sich kein Unterschied in der Bindungskapazität von neurovirulenten und nicht neurovirulenten Viren.

Im Gegensatz zu den Virusbindungsversuchen wurde bei den Infektionsversuchen (Tab. 4.9) ein interessantes Ergebnis erzielt. Zunächst einmal fiel auf, dass alle humanen Hirnzelllinien von den getesteten Viren infiziert werden konnten, was vermutlich an der CD46-Rezeptorbenutzung liegt, denn bei allen getesteten humanen Hirnzellen konnte eine CD46-Expression, jedoch keine SLAM-Expression nachgewiesen werden. Weiterhin ist aufgefallen, dass die zellkulturadaptierten Stämme, wie Edmonston oder CAM/Vero, die Zellen viel effizienter und schneller infizieren konnten als die Rekombinanten. Es konnte aber kein Unterschied zwischen neurovirulenten und nicht neurovirulenten Stämmen beobachtet werden. Bei der Mäusezelllinie DBT und den beiden Rattenzelllinien C6 und PC-12, die alle kein CD46 exprimieren, konnte keine Infektion nachgewiesen werden. Die Infektion der primären gemischten Hirnzellen von Lewis-Ratten führte jedoch auch in Abwesenheit von CD46 zur Infektion. Diejenigen Zellen, die mit den auch schon *in vivo* virulenten Stämmen infiziert wurden, zeigten deutlich stärkere virale Hüllproteinexpression als die nicht neurovirulenten Stämme. Diese Daten korrelieren mit den *in vivo* Versuchen und unterstützen die Arbeitshypothese 2. Somit könnten mit diesem Zellkultursystem weiterführende Experimente durchgeführt werden.

5.4 Zytokinstatus in unterschiedlich infizierten Rattenhirnen

Bei viralen Infektionen konnten bei sehr vielen Zelltypen einschließlich Astrozyten und Oligodendrozyten die Induktion der Sekretion von Zytokinen nachgewiesen werden (Merill, 1994). Von Schneider-Schaulies *et al.* (1993) wurde die Induktion von Zytokinen nach primärer und persistenter MV-Infektion bei humanen Gliazellen untersucht. Bei SSPE-Patienten sind vorwiegend Oligodendrozyten und die Neurone die Zielzellen der MV-Infektion (Jabbour *et al.*, 1972, McQuaid und Cosby, 2002). Es wurde auch die Infektion von Astrozyten, Makrophagen, Endothelzellen und infiltrierende Lymphozyten beobachtet (Allen *et al.*, 1996; Cosby *et al.*, 1989; Kirk *et al.*, 1991). Die Infektion der Astrozyten *in vivo* wird jedoch kontrovers diskutiert (Allen *et al.*, 1996; Budka *et al.*, 1982; Esiri *et al.*, 1982; Kumanishi und In, 1979; McQuaid *et al.*, 1993). In Zellkultur konnte eine Masernvirus-

Infektion bei primären Ratten-Astrozyten beobachtet werden (Schneider-Schaulies *et al.*, 1990). Anhand der histologischen Untersuchungen der infizierten Rattenhirne (siehe Abb. 5.2), konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass es sich bei den infizierten Zellen um Neurone handelt.

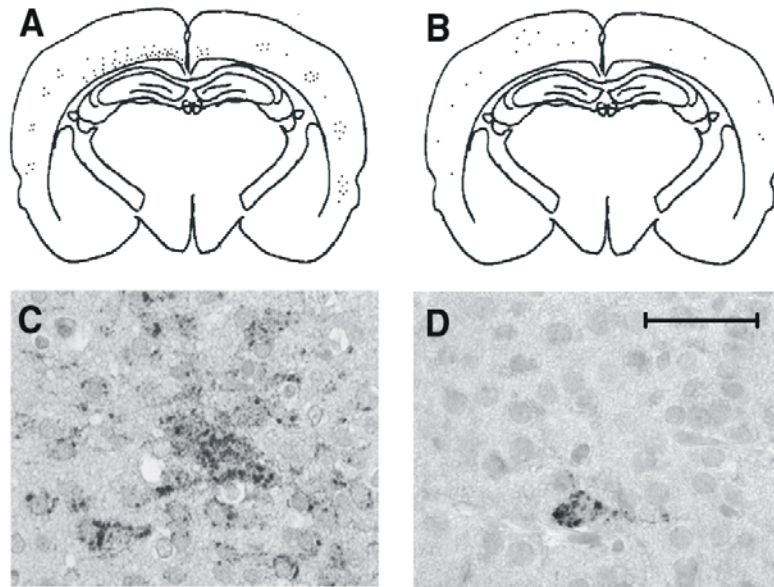


Abb. 5.2: Immunhistologische Analyse der Hirninfektionen mit einem neurovirulenten und einem nicht neurovirulenten rekombinanten MV. Färbung vom MV-N-Protein in vorderen Hirnschnitten der Ratten 5 Tage nach Infektion mit EdtagCAMH (A und C) und 10 Tage nach Infektion mit Rekombinante 6 (B und D). Die schematisch dargestellten Hirnschnitte von immunhistologisch gefärbten Hirnen (A und B) zeigen die Immunreaktivität mit dem mAk F227 gegen MV-N für EdtagCAMH (C) und Rekombinante 6 (D) bei geringer Vergrößerung. Höhere Auflösungen zeigen, dass die Mehrzahl der Neurone bei EdtagCAMH (C) infizierten Hirnen MV-N positiv ist, wohingegen nur einzelne verstreute Neurone im Hirn Rekombinante 6 (D) infizierter Tiere positiv sind. (Balken = 50µm)

Die Rolle einzelner Zytokine in Gehirn nach MV-Infektion, besonders bei SSPE-Patienten, wurde schon mehrfach beschrieben. Immunhistochemische Färbungen der Gehirnschnitten von SSPE-Patienten zeigten IL-6, TNF-alpha, IL-1beta, IL-2 und IFN-gamma positive Zellen. Die SSPE-Befunde stellen aber das späte Stadium der persistierenden MV-Infektion dar und geben keinen Aufschluss über die Zytokinexpression beim Ausbruch bzw. in der frühen Phase der Virusinfektion, worüber bislang wenig bekannt ist. Von Schneider-Schaulies *et al.* (1993) wurde die Zytokininduktion in Zellkultur im Hinblick auf primäre und persistente MV-Infektion untersucht. Es wurde bei primären Infektionen die Expression von IL-1beta, IL-6, IFN-beta und TNF-alpha beobachtet. Ähnliche Ergebnisse konnten auch bei anderen Virussystemen erzielt werden (NDV – Liebermann *et al.*, 1989; VSV – van Damme *et al.*, 1989; HIV, VSV, LCMV – Frei *et al.*, 1989; Merrill und Chen, 1991; Moskopfidis *et al.*,

1991), deshalb scheint die Synthese dieser Zytokine ein allgemeines Charakteristikum bei primären viralen Erkrankungen des ZNS zu sein.

In der Veröffentlichung von Khuth *et al.* (2001) wurden die Zytokininduktion von einer Morbillivirus-Infektion (CDV) im ZNS von Mäusen untersucht. Es wurden u.a. dabei die proinflammatorischen Zytokine (IL-6, TNF-alpha, IFN-gamma - T_H1-Antwort) und die anti-inflammatorischen Zytokine (IL-4 und IL-10 - T_H2-Antwort) betrachtet und gefunden, dass die proinflammatorischen Signale deutlich stärker waren, als die anti-inflammatorischen. Von Finke *et al.* (1995) wurde die Bedeutung von IFN-gamma bei der Kontrolle der MV induzierten Enzephalitis im Mausmodell beschrieben.

In dieser Arbeit wurde die Zytokininduktion der Hirnzellen nach intracerebraler MV-Infektion untersucht. Nachdem anhand der oben beschriebenen Untersuchungen die Induktion von verschiedenen Zytokinen bei der MV-Infektion im Gehirn eine Rolle spielt, sollte nun in erster Linie festgestellt werden, ob es allgemein einen Unterschied bei der Zytokininduktion durch neurovirulente und nicht neurovirulente Viren gibt. Einen Unterschied bei der Induktion der unterschiedlich neurovirulenten Viren konnte nur bei IFN-beta und IFN-gamma festgestellt werden, wobei auch eine leichte Expression von IFN-gamma bei mit nicht neurovirulenten Viren infizierten Hirnen vorhanden ist, im Gegensatz zu IFN-beta, das nur in Hirnen, die mit neurovirulenten Viren infiziert wurden, nachgewiesen werden konnte.

Es findet auf Neuronen kaum eine Antigenpräsentation statt, aber durch die Aktivierung von ZNS-Zellen mit Interferonen vom Typ I (IFN-alpha/-beta) kommt es zur verstärkten Expression von MHC-Klasse-I und auch von MHC-II-Molekülen. Dies ist eine Eigenschaft der MV-Infektion, die sowohl bei der SSPE als auch bei NSE-CD46 transgenen Mäusen gezeigt wurde (Gogate *et al.*, 1991; Manchester *et al.*, 1999). MHC-I konnte nicht bei mit MV infizierten Neuronen (Fang *et al.*, 2001; Manchester *et al.*, 1999) detektiert werden, obwohl eine MHC-I mRNA-Expression bei Neuronen durch in situ Hybridisation in SSPE Gehirnen nachgewiesen werden konnte (Gogate *et al.*, 1996). Die Aufregulation der MHC-I-Expression nach MV-Infektion bei Glia-Zellen findet vorwiegend durch IFN-beta statt (Dhib-Jalbut *et al.*, 1995). IFN-alpha und -beta werden auch als die antiviralen Interferone bezeichnet, da diese Interferone, von infizierten Zellen ausgeschüttet, Nachbarzellen vor viraler Infektion schützen. IFN-beta konnte in dieser Arbeit nur bei mit den neurovirulenten Rekombinanten infizierten Hirnen nachgewiesen werden. IFN-alpha konnte in Versuch 4.3.2 bei allen Rattenhirnen (infiziert oder uninfiziert) nachgewiesen werden. IFN-alpha und -beta wurden

im Serum und der Zerebrospinalflüssigkeit von SSPE Patienten nachgewiesen (Joncas *et al.*, 1976) und für die Einschränkung der MV-Gen-Expression in SSPE-Hirnen verantwortlich gemacht (Carrigan und Knox 1990; Fuji *et al.*, 1988). IFN-gamma als Typ II-Interferon, welches sich von den anderen beiden dadurch unterscheidet, dass es von aktivierten NK-Zellen sowie vor allem von T-Effektorzellen produziert wird und daher hauptsächlich nach der Induktion der adaptiven Immunantwort auftritt, wurde verstärkt in den mit neurovirulenten Viren infizierten Hirnen exprimiert, es konnten aber auch schwache Banden bei den mit nicht neurovirulenten Viren infizierten Hirnen nachgewiesen werden.

In der Arbeit von Ghali (1998) wurde das Maximum für die Induktion der TNF-alpha Expression nach MV-Infektion bei Mäusen bereits 6 Stunden nach Infektion erreicht und eine Expressionsabnahme im weiteren Infektionsverlauf beobachtet. In dieser Arbeit konnte TNF-alpha jedoch bei keiner Probe nachgewiesen werden, dies könnte dafür sprechen, dass die Auswahl der Primer nicht spezifisch genug war. In Analogie zu den Befunden von Ghali könnte die TNF-alpha-Expression jedoch auch bei den untersuchten Hirnen schon völlig eingestellt worden sein.

Die Untersuchung der Zytokine IL-1alpha, IL-4, IL-6, IL-10 und IL-12 zeigte keinen Unterschied bezüglich einer differenzierten Induktion durch die verschiedenen neurovirulenten Viren. Die IL-6 Expression von Neuronen wird in der Literatur beschrieben (Ringheim *et al.*, 1995; Schöbitz *et al.*, 1992, 1993) und auch die Induktion der IL-6 Expression bei Oligodendrozyten, Mikroglia, Fibroblasten, Astrozyten und T-Zellen nach MV-Infektion wurde beschrieben (Finke *et al.*, 1995; Schneider-Schaulies *et al.*, 1993; Yamabe *et al.*, 1994). Die Expression von IL-6 konnte auch hier gezeigt werden (Abb. 4.19j), wobei die Signalstärke jeweils bei länger infizierten Hirnen zunimmt, was mit der Vermehrung der Gehirnzellen und damit der höheren Expression korrelieren könnte. Im Hirngewebe könnte ein erhöhter IL-6 Level während einer persistenten Infektion die intrathekale Differenzierung vom B-Lymphozyten beeinflussen und die Anwesenheit von oligoklonalen Antikörpern erhöhen, wie es bei SSPE Patienten in der Zerebrospinalflüssigkeit gefunden wurde (ter Meulen *et al.*, 1983). Als Folge dieser hohen Antikörpertiter könnte eine Herunterregulation der MV-Replikation über den Mechanismus der Antikörper vermittelten Modulation stattfinden, wie es an Mechanismen in *in vitro* und *in vivo* gezeigt wurde (Barret *et al.*, 1985; Fujinami und Oldstone, 1980; Liebert *et al.*, 1990; Schneider-Schaulies *et al.*, 1992). Hier muss jedoch noch einmal darauf hingewiesen werden, dass die Expressionsbefunde bei SSPE-

Patienten ein spätes Stadium der Infektion im immunkompetenten Wirt darstellen, während in neugeborenen Ratten das Immunsystem noch nicht ausgereift ist.

IL-12 ist ein heterodimeres Zytokin das von Dendritischen Zellen und Makrophagen sezerniert wird und die IFN-gamma Produktion von NK-Zellen und T-Lymphozyten induziert und B-Zellen aktivieren kann (Airoldi *et al.*, 2002). Nach Masern-Infektion von primären humanen Makrophagen konnte beobachtet werden, dass die IL-12 Produktion deutlich herunterreguliert ist (Karp *et al.*, 1996; Polack *et al.*, 2002), was in Zusammenhang mit der Immunsuppression nach MV Infektion gebracht wird. Bei der Entstehung von autoimmun- und virus-induzierter ZNS Demyelinisierung im Mausmodell wurde der unterschiedliche Einfluss von IL-12 beschrieben (Bright *et al.*, 1999), der für die Entstehung einer T_H1-Zell-Antwort eine Rolle spielt. Bei der Untersuchung der Ratten-Hirnen in dieser Arbeit konnte eine starke IL-12 Expression bei allen Hirnen nachgewiesen werden, die nicht infektionsspezifisch war.

Die Expression von LIF mRNA wurde von Patterson und Fann (1992) im ZNS beschrieben und konnte hier (Abb. 4.19c) auch bei den Untersuchungen in infizierten als auch in uninfizierten Rattenhirnen detektiert werden. Eine starke LIF mRNA Expression wurde erstmals von McQuaid *et al.* (1997) in Gehirnen von Patienten mit SSPE beschrieben. RNA-Expression konnte auch bei Neuronen gefunden werden. Es konnte auch durch sensitive Nachweismethoden bei normalen Hirnen detektiert werden und dies deutet an, dass durch die MV Infektion eine Hochregulation von LIF stattfindet (McQuaid *et al.*, 1997), was aber bei den Ratten Hirnen nicht beobachtet werden konnte. LIF kann regulatorisch auf Zellwachstum und Differenzierung wirken und hat ein breites Spektrum von Wirkmechanismen, die in einigen Fällen parallel zu denen der IL-6 Wirkung laufen (Patterson und Fann, 1992).

5.5 CD46 transgene Ratten - ein geeignetes Tiermodell?

Bislang wurden die Untersuchungen von Pathogenitätsmechanismen durch das Fehlen eines geeigneten und kostengünstigen Kleintiermodelles erschwert. Zwar kann eine Enzephalitis mit einem nageradaptierten MV-Stamm in Hamstern, Mäusen und Ratten (Burnstein *et al.*, 1963; Griffin *et al.*, 1974; Liebert und ter Meulen, 1987; Niewiesk *et al.*, 1993) induziert werden, aber dort sind die Rezeptoren für MV nicht bekannt. Um deshalb geeignetere Tiermodelle zu untersuchen, wurden CD46-transgene Mäuse und Ratten hergestellt. In dieser

Arbeit wurden auf den genetischen Hintergrund von Lewis-Ratten zurückgekreuzte Tiere verwendet, da die Lewis-Ratten schon als ZNS Modell für MV induzierte Gehirnerkrankungen gut charakterisiert wurden (Liebert und ter Meulen, 1987).

In dem Versuch 4.4.2 wurde das Vorhandensein des CD46-Gens in den verschiedenen Organen normaler und transgener Lewis-Ratten mittels PCR überprüft. Bei den normalen Ratten konnte in keinem Organ durch die spezifischen CD46-Primer ein Amplifikat erzielt werden (Abb. 4.20), jedoch war bei den transgenen Ratten das humane CD46 in allen untersuchten Organen vorhanden (Abb. 4.21). Anhand des Western-Blot-Analyse (Versuch 4.4.3) wurde der Nachweis für die Genexpression je nach Gewebetyp überprüft (Abb. 4.22 und Abb. 4.23). Von Johnstone *et al.* (1993) wurden Untersuchungen bezüglich der Expressionsform des CD46 in unterschiedlichen menschlichen Geweben durchgeführt, und gewebetypabhängige Spleißformen gefunden. Während in den meisten Geweben beide durch unterschiedliches Spleißen hervorgerufenen Formen auftreten, wird im Gehirn nur die kleinere 56kDa Form exprimiert. Dasselbe Muster konnte hier für die Ratten gezeigt werden (Abb. 4.23). Es wurde früher gezeigt, dass alle verschiedenen natürlichen Isoformen als MV-Rezeptor fungieren können (Evlashov *et al.*, 2000; Gerlier *et al.*, 1994; Manchester *et al.*, 1994; Varior-Krishnan *et al.*, 1994). In der Immunfluoreszenzanalyse (4.4.4) konnten ebenfalls mit CD46 spezifischen Antikörpern die CD46-Expression auf Milzzellen der transgenen Ratten detektiert werden (Abb. 4.24). Die starke Expression des CD46 auf unstimulierten transgenen Milzzellen (Abb. 4.24d), kann durch die Stimulation mit ConA noch verstärkt werden (Abb. 4.24e). Diese Milzzellen wurden auch für die *in vitro* Infektionsversuche (4.4.5) verwendet. Die Zellen wurden ohne und nach Stimulation mit den verschiedenen Viren infiziert und die Expression des MV-H-Proteins auf der Zelloberfläche detektiert. Normale Lewis-Milzzellen zeigen keine signifikante Expression des Virusproteins (Abb. 4.25), aber auf den unstimulierten transgenen Zellen kann nach Infektion mit Wildtyp und Rekombinante 1 MV-Hüll-Protein nachgewiesen werden. Bei stimulierten Zellen konnte auch die Expression des Virusproteins vom Wildtypvirus und der Rekombinanten 1 auf der Oberfläche nachgewiesen werden. Allgemein ist aber die Expression viel schwächer als bei den zur Kontrolle infizierten Vero-Zellen. Untersuchungen mit Fibroblasten transgener Sprague-Dawley-Ratten zeigten, dass Virus an CD46 bindet und auch von der Zelle aufgenommen wird, dass aber die Virusreplikation durch intrazelluläre Faktoren blockiert wird (Niewiesk *et al.*, 1997). Auch Blixenkrone-Moller *et al.* (1998) zeigten, dass CD46 in deren transgenen Mausmodell nur zur Virusaufnahme verhilft, dass aber auch in diesen

transgenen Zellen weitere Faktoren fehlen, die dem Virus in permissiven Zellen zur vollständigen Replikation zur Verfügung stehen. Dies scheint auch bei den transgenen Ratten der Fall zu sein.

Bei intracerebraler Infektion der Nager scheinen intrazelluläre Faktoren die virale Replikation nicht zu blockieren. Neben dem von Niewiesk *et al.* (1997) beschriebenen CD46 transgenen Sprague-Dawley-Ratten Modell und dem in dieser Arbeit beschriebenen transgenen Lewis-Ratten Modell, wurden auch verschiedene transgene Mausmodelle beschrieben, ein Vergleich dieser Modelle wird in der Arbeit von Manchester und Rall (2001) gegeben. Im Folgenden sind einige Ergebnisse mit den unterschiedlichen Modellen beschrieben.

Intracerebrale Infektionen führten im Maus-Modell nach Blixenkrone-Moller *et al.* (1998) und Evlashev *et al.* (2000) sowohl bei transgenen als auch bei nicht transgenen Tieren nach i.c. Injektion zu einer Infektion. Dieses konnte auch von Duprex *et al.* (2000) in deren transgenen Maus-Modell mit rekombinanten GFP MV beobachtet werden. Bei dem transgenen Maus-Modell von Rall *et al.* (1997) wurde nur eine Infektion der Neuronen bei den transgenen nicht aber bei den normalen Mäusen nach i.c. Infektion mit dem MV-Edm-Stamm beobachtet. Dasselbe wurde nach MV-Wildtyp-Infektion von Manchester *et al.* (1999) beschrieben. Von Lawrence *et al.* (2000) wurde die CD46 unabhängige Virusausbreitung bei Neuronen beschrieben. Hier findet anders als bei anderen Zelltypen keine Synzytienbildung statt, es ist zwar der Zellkontakt notwendig aber nicht die Anwesenheit von CD46. In dieser Arbeit mit den transgenen Lewis-Ratten konnte nach i.c. Infektion sowohl mit Wildtyp- als auch mit Edmonston-Virus keine Infektion der Gehirnzellen der transgenen Lewis-Ratten beobachtet werden (Abb. 4.26).

Als Fazit kann daraus geschlossen werden, dass der Tropismus nicht alleine durch die Anwesenheit des Virusrezeptors bestimmt wird, sondern dass auch eine ganze Reihe von anderen noch unklaren Zellfaktoren stimmen müssen, damit es zu einer Infektion, Replikation und Virusausbreitung kommt.

6 Zusammenfassung

6.1 Zusammenfassung

Masernvirus (MV) ist ein negativ-strängiges RNA-Virus, das im Menschen und im Nagermodell zu akuten und subakuten Enzephalitiden führen kann. Es wurde beschrieben, dass bestimmte Antikörperescape-Mutanten des MV neurovirulent, andere nicht neurovirulent sind (Liebert *et al.*, 1994). Mit Hilfe von rekombinanten Masernviren, konnte ich diejenigen Aminosäuren charakterisieren, die einerseits für die Bindung monoklonaler, neutralisierender anti-MV-H-Antikörper (K29, K71, Nc32 und L77) und andererseits für die Neurovirulenz verantwortlich sind.

Bei den rekombinanten MV wurde das von Duprex *et al.* (1999) als Neurovirulenz vermittelnd beschriebene H-Gen des nagerhirnadaptierten neurovirulenten CAM/RB-Stammes in das Grundgerüst des nicht neurovirulenten Edtag (molekularer Klon des Vakzinestammes Edm) kloniert. Über gerichtete Mutagenese wurden die jeweiligen Mutationen in dieses CAM/RB H-Gen eingefügt. Mittels der FACS-Analyse konnten die Aminosäureänderungen identifiziert werden, die für die Bindung der jeweiligen Antikörper verantwortlich sind. Sie befinden sich nach einem Strukturmodell der H-Proteine (Langedijk *et al.*, 1997) im Membran-distalen Teil, den so genannten Propellern. Im Einzelnen sind folgende Aminosäureänderungen im Hämagglutinin-Protein für den Escape verantwortlich: L77 – 377 Arg → Gln und 378 Met → Lys; Nc32 – 388 Gly → Ser; K71 – 492 Glu → Lys und 550 Ser → Pro; K29 – 535 Glu → Gly. Es konnte ferner gezeigt werden, dass die beiden Aminosäureveränderungen an den Positionen 195 und 200 gemeinsam für die Neurovirulenz verantwortlich sind und nicht assoziiert sind mit den Mutationen für den Antikörperescape. Der Aminosäureaustausch an Position 200 bei neurovirulenten Viren führt zum Verlust einer benutzten Glykosylierungsstelle. Diese Mutation ist jedoch nicht alleine für das unterschiedliche Neurovirulenzverhalten der Viren verantwortlich, sondern es muss gleichzeitig der Austausch an Position 195 vorhanden sein, der eine positive Ladung im H-Molekül entfernt. Diese beiden Mutationen sind nach dem Strukturmodell nach Langedijk im

Stamm2-Bereich angesiedelt. Sind im H-Protein an Stelle 195 und 200 die Aminosäuren Gly und Ser vorhanden, so findet im Gehirn neugeborener Lewis-Ratten eine verstärkte Virusvermehrung und Ausbreitung statt, die die akute Enzephalitis mit Expression typischer proinflammatorischer Zytokine zur Folge hat. Werden an Stelle 195 und 200 die Aminosäuren Arg und Asn exprimiert, so ist der Verlauf der Infektion inapparent.

In dieser Arbeit wurde auch ein Zellkultursystem gemischter Hirnzellen neugeborener Lewis-Ratten etabliert, das die Unterschiede der Virusausbreitung *in vivo* reflektiert und mit dem weitere Untersuchungen zum Mechanismus der Neurovirulenz durchgeführt werden könnten. Anhand der durchgeführten Untersuchungen mit Ratten des CD46 transgenen Lewis-Modells konnte gezeigt werden, dass die Anwesenheit des Rezeptors CD46 das Virulenzverhalten der getesteten Viren nicht beeinflusst. Weder mit dem Vakzinestamm Edm noch mit einem nicht an Nager adaptierten Wildtypstamm, konnte nach intracerebraler Injektion eine akute Enzephalitis induziert werden.

Die Untersuchungen zeigen, dass die Neurovirulenz des an Nager-adaptierte MV-Stammes CAM/RB essentiell von den Aminosäuren Gly und Ser an Position 195 und 200 im H-Protein abhängt und nicht durch die transgene Expression zellulärer Rezeptoren für MV vermittelt werden kann.

6.2 Summary

Measles virus (MV) is a negative stranded RNA-virus, which may lead to acute and subacute encephalitis in men and experimentally also in rodents. It has been described that certain antibody escape mutants of MV are neurovirulent, whereas others are non-virulent (Liebert *et al.*, 1994).

Here I determined with the help of recombinant MV the amino acids which are responsible for the binding of neutralizing monoclonal anti MV-H-antibodies (K29, K71, Nc32 and L77) or for neurovirulence of MV.

The H-gene of the rodent brain adapted strain CAM/RB which was described for determining neurovirulence by Duprex *et al.* (1999) was introduced into the non-neurovirulent backbone of Edtag, which is the molecular clone of the vaccine strain Edm. The respective mutations were introduced by site directed mutagenesis. In FACS-analysis I could determine the amino acid changes which are responsible for the binding of the anti H-antibodies. In a structural

model for MV-H (Langedijk *et al.*, 1997) this amino acids reside in the membrane distal part of the molecule - the so called propeller. The following amino acid changes in the hemagglutinin protein are responsible for the antibody escape: L77 – 377 Arg → Gln und 378 Met → Lys; Nc32 – 388 Gly → Ser; K71 – 492 Glu → Lys und 550 Ser → Pro; K29 – 535 Glu → Gly. In addition I found that the combined amino acid changes at positions 195 and 200 are responsible for neurovirulence but are not associated with the antibody escape. The amino acid change at position 200 leads to the loss of a used glycosylation site in neurovirulent strains. The mutation at position 200 is not alone responsible for the neurovirulence but requires the second associated mutation at position 195, which deletes an additional positive charge in the H-protein. These two mutations which are responsible for the neurovirulence reside in the stem2 region of the structural model according to Langedijk.

If in the H-protein the amino acids at position 195 and 200 are Gly and Ser, the virus multiplication and spread is enhanced in the brain of newborn Lewis-rats and causes an acute encephalitis with expression of typical proinflammatory cytokines. If at position 195 and 200 the amino acids Arg and Asn are present, the infection stays inapparent.

I could also establish a cell culture system of mixed primary rat brain cells, which reflects the difference in the viral spread *in vivo* and which may be to used further to investigate the mechanisms responsible for neurovirulence.

Results obtained with CD46 transgenic Lewis-rats showed that the presence of the MV receptor CD46 does not influence the virulence of the tested strains. Neither the vaccine strain nor a wildtype strain not adapted to rodents could induce acute encephalitis after intracerebral injection.

These findings suggest that the neurovirulence of the rodent-brain adapted MV-strain CAM/RB depends essentially on amino acids Gly and Ser at positions 195 and 200 in the H-protein, and cannot be mediated by the transgenic expression of cellular receptors for MV.

7 Literaturverzeichnis

Aaby, P., M. Andersen, M. Sodemann, M. Jakobsen, J. Gomes, and M. Fernandes 1993. Reduced childhood mortality after standard measles vaccination at 4-8 months compared with 9-11 months of age *Bmj*. **307**:1308-11.

Airoldi, I., R. Guglielmino, G. Carra, A. Corcione, F. Gerosa, G. Tadorelli, G. Trinchieri, and V. Pistoia 2002. The interleukin-12 and interleukin-12 receptor system in normal and transformed human B lymphocytes *Haematologica*. **87**:434-42.

Allen, I. V., S. McQuaid, J. McMahan, J. Kirk, and R. McConnell 1996. The significance of measles virus antigen and genome distribution in the CNS in SSPE for mechanisms of viral spread and demyelination *J Neuropathol Exp Neurol*. **55**:471-80.

Amano T, Richelson E, Nirenberg M. 1972. Neurotransmitter synthesis by neuroblastoma clones (neuroblast differentiation-cell culture-choline acetyltransferase-acetylcholinesterase-tyrosine hydroxylase-axons-dendrites). *Proc Natl Acad Sci U S A* **69**(1):258-63

Attibele, N., P. R. Wyde, J. Trial, S. C. Smole, C. W. Smith, and R. D. Rossen 1993. Measles virus-induced changes in leukocyte function antigen 1 expression and leukocyte aggregation: possible role in measles virus pathogenesis *J Virol*. **67**:1075-9.

Aversa, G., C. C. Chang, J. M. Carballido, B. G. Cocks, and J. E. de Vries 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 *J Immunol*. **158**:4036-44.

Aversa, G., J. Carballido, J. Punnonen, C. C. Chang, T. Hauser, B. G. Cocks, and J. E. De Vries 1997. SLAM and its role in T cell activation and Th cell responses *Immunol Cell Biol*. **75**:202-5.

Baczko, K., J. Lampe, U. G. Liebert, U. Brinckmann, V. ter Meulen, I. Pardowitz, H. Budka, S. L. Cosby, S. Isserte, and B. K. Rima 1993. Clonal expansion of hypermutated measles virus in a SSPE brain *Virology*. **197**:188-95.

Ballart, I., M. Huber, A. Schmid, R. Cattaneo, and M. A. Billeter 1991. Functional and nonfunctional measles virus matrix genes from lethal human brain infections *J Virol*. **65**:3161-6.

- Barrett, P. N., K. Koschel, M. Carter, and V. ter Meulen** 1985. Effect of measles virus antibodies on a measles SSPE virus persistently infected C6 rat glioma cell line *J Gen Virol.* **66**:1411-21.
- Benda, P., J. Lightbody, G. Sato, L. Levine, and W. Sweet** 1968. Differentiated rat glial cell strain in tissue culture *Science.* **161**:370-1.
- Biedler, J. L., L. Helson, and B. A. Spengler** 1973. Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture *Cancer Res.* **33**:2643-52.
- Bigner, D. D.** 1981. Biology of gliomas: potential clinical implications of glioma cellular heterogeneity *Neurosurgery.* **9**:320-6.
- Black, F. L.** 1989. Measles active and passive immunity in a worldwide perspective *Prog Med Virol.* **36**:1-33.
- Blixenkron-Moller, M., A. Bernard, A. Bencsik, N. Sixt, L. E. Diamond, J. S. Logan, and T. F. Wild** 1998. Role of CD46 in measles virus infection in CD46 transgenic mice *Virology.* **249**:238-48.
- Blumberg, B. M., M. Leppert, and D. Kolakofsky** 1981. Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsid protein may control VSV genome replication *Cell.* **23**:837-45.
- Bright, J. J., C. Du, and S. Sriram** 1999. Tyrphostin B42 inhibits IL-12-induced tyrosine phosphorylation and activation of Janus kinase-2 and prevents experimental allergic encephalomyelitis *J Immunol.* **162**:6255-62.
- Bright, J. J., M. Rodriguez, and S. Sriram** 1999. Differential influence of interleukin-12 in the pathogenesis of autoimmune and virus-induced central nervous system demyelination *J Virol.* **73**:1637-9.
- Brockus, C. L., and P. R. Grimstad** 1999. Sequence analysis of the medium (M) segment of Cache Valley virus, with comparison to other Bunyaviridae *Virus Genes.* **19**:73-83.
- Buchholz, C. J., D. Koller, P. Devaux, C. Mumenthaler, J. Schneider-Schaulies, W. Braun, D. Gerlier, and R. Cattaneo** 1997. Mapping of the primary binding site of measles virus to its receptor CD46 *J Biol Chem.* **272**:22072-9.
- Buchholz, C. J., U. Schneider, P. Devaux, D. Gerlier, and R. Cattaneo** 1996. Cell entry by measles virus: long hybrid receptors uncouple binding from membrane fusion *J Virol.* **70**:3716-23.
- Budka, H., H. Lassmann, and T. Popow-Kraupp** 1982. Measles virus antigen in panencephalitis. An immunomorphological study stressing dendritic involvement in SSPE *Acta Neuropathol.* **56**:52-62.
- Burnstein, T., J. H. Jensen, and B. H. Waksman.** 1963. The development of a neurotropic strain of measles virus in hamsters and mice. *J. Infect. Dis.* **113**:265-272.

Carballido, J. M., A. Faith, N. Carballido-Perrig, and K. Blaser 1997. The intensity of T cell receptor engagement determines the cytokine pattern of human allergen-specific T helper cells *Eur J Immunol.* **27**:515-21.

Carrigan, D. R., and K. K. Knox 1990. Identification of interferon-resistant subpopulations in several strains of measles virus: positive selection by growth of the virus in brain tissue *J Virol.* **64**:1606-15.

Carter, M. J., and V. Ter Meulen 1983. Subacute sclerosing panencephalitis: are antigenic changes involved in measles virus persistence? *Prog Brain Res.* **59**:163-71.

Carter, M. J., M. M. Willcocks, and V. ter Meulen 1983. Defective translation of measles virus matrix protein in a subacute sclerosing panencephalitis cell line *Nature.* **305**:153-5.

Carter, M. J., M. M. Willcocks, S. Loffler, and V. Ter Meulen 1983. Comparison of lytic and persistent measles virus matrix proteins by competition radioimmunoassay *J Gen Virol.* **64**:1801-5.

Cathomen, T., B. Mrkic, D. Spehner, R. Drillien, R. Naef, J. Pavlovic, A. Aguzzi, M. A. Billeter, and R. Cattaneo 1998. A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain *Embo J.* **17**:3899-908.

Cathomen, T., H. Y. Naim, and R. Cattaneo 1998. Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence *J Virol.* **72**:1224-34.

Cattaneo, R., A. Schmid, D. Eschle, K. Baczko, V. ter Meulen, and M. A. Billeter 1988. Biased hypermutation and other genetic changes in defective measles viruses in human brain infections *Cell.* **55**:255-65.

Cattaneo, R., and J. K. Rose 1993. Cell fusion by the envelope glycoproteins of persistent measles viruses which caused lethal human brain disease *J Virol.* **67**:1493-502.

Cattaneo, R., and M. A. Billeter 1992. Mutations and A/I hypermutations in measles virus persistent infections *Curr Top Microbiol Immunol.* **176**:63-74.

Cattaneo, R., G. Rebmann, K. Baczko, V. ter Meulen, and M. A. Billeter 1987. Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains *Virology.* **160**:523-6.

Cocks, B. G., C. C. Chang, J. M. Carballido, H. Yssel, J. E. de Vries, and G. Aversa 1995. A novel receptor involved in T-cell activation *Nature.* **376**:260-3.

Coffey, A. J., R. A. Brooksbank, O. Brandau, T. Oohashi, G. R. Howell, J. M. Bye, A. P. Cahn, J. Durham, P. Heath, P. Wray, R. Pavitt, J. Wilkinson, M. Leversha, E. Huckle, C. J. Shaw-Smith, A. Dunham, S. Rhodes, V. Schuster, G. Porta, L. Yin, P. Serafini, B. Sylla, M. Zollo, B. Franco, D. R. Bentley, and et al. 1998. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene *Nat Genet.* **20**:129-35.

- Cosby, S. L., S. McQuaid, M. J. Taylor, M. Bailey, B. K. Rima, S. J. Martin, and I. V. Allen** 1989. Examination of eight cases of multiple sclerosis and 56 neurological and non-neurological controls for genomic sequences of measles virus, canine distemper virus, simian virus 5 and rubella virus *J Gen Virol.* **70**:2027-36.
- Crespi, M., J. K. Struthers, A. N. Smith, and S. F. Lyons** 1988. Interferon status after measles virus infection *S Afr Med J.* **73**:711-2.
- Detels, R., J. A. Brody, J. McNew, and A. H. Edgar** 1973. Further epidemiological studies of subacute sclerosing panencephalitis *Lancet.* **2**:11-4.
- Devaux, P., B. Loveland, D. Christiansen, J. Milland, and D. Gerlier** 1996. Interactions between the ectodomains of haemagglutinin and CD46 as a primary step in measles virus entry *J Gen Virol.* **77**:1477-81.
- Dhib-Jalbut, S. S., Q. Xia, P. D. Drew, and P. T. Swoveland** 1995. Differential up-regulation of HLA class I molecules on neuronal and glial cell lines by virus infection correlates with differential induction of IFN-beta *J Immunol.* **155**:2096-108.
- Dietzschold, B., T. J. Wiktor, J. Q. Trojanowski, R. I. Macfarlan, W. H. Wunner, M. J. Torres-Anjel, and H. Koprowski** 1985. Differences in cell-to-cell spread of pathogenic and apathogenic rabies virus in vivo and in vitro *J Virol.* **56**:12-8.
- Dorig, R. E., A. Marcil, A. Chopra, and C. D. Richardson** 1993. The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain) *Cell.* **75**:295-305.
- Dorig, R. E., A. Marcil, and C. D. Richardson** 1994. CD46, a primate-specific receptor for measles virus *Trends Microbiol.* **2**:312-8.
- Dropulic, L. K., J. M. Hardwick, and D. E. Griffin** 1997. A single amino acid change in the E2 glycoprotein of Sindbis virus confers neurovirulence by altering an early step of virus replication *J Virol.* **71**:6100-5.
- Duclos, P., and B. J. Ward** 1998. Measles vaccines: a review of adverse events *Drug Saf.* **19**:435-54.
- Duprex, W. P., I. Duffy, S. McQuaid, L. Hamill, S. L. Cosby, M. A. Billeter, J. Schneider-Schaulies, V. ter Meulen, and B. K. Rima** 1999. The H gene of rodent brain-adapted measles virus confers neurovirulence to the Edmonston vaccine strain *J Virol.* **73**:6916-22.
- Duprex, W. P., S. McQuaid, B. Roscic-Mrkic, R. Cattaneo, C. McCallister, and B. K. Rima** 2000. In vitro and in vivo infection of neural cells by a recombinant measles virus expressing enhanced green fluorescent protein *J Virol.* **74**:7972-9.
- Duprex, W. P., S. McQuaid, L. Hangartner, M. A. Billeter, and B. K. Rima** 1999. Observation of measles virus cell-to-cell spread in astrocytoma cells by using a green fluorescent protein-expressing recombinant virus *J Virol.* **73**:9568-75.

Erlenhofer, C., W. J. Wurzer, S. Loffler, S. Schneider-Schaulies, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies 2001. CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition *J Virol.* **75**:4499-505.

Esiri, M. M., D. R. Oppenheimer, B. Brownell, and M. Haire 1982. Distribution of measles antigen and immunoglobulin-containing cells in the CNS in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) and atypical measles encephalitis *J Neurol Sci.* **53**:29-43.

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

Evlashv, A., E. Moyse, H. Valentin, O. Azocar, M. C. Trescol-Biemont, J. C. Marie, C. Rabourdin-Combe, and B. Horvat 2000. Productive measles virus brain infection and apoptosis in CD46 transgenic mice *J Virol.* **74**:1373-82.

Fang, Y. Y., Z. M. Song, and S. Dhib-Jalbut 2001. Mechanism of measles virus failure to activate NF-kappaB in neuronal cells *J Neurovirol.* **7**:25-34.

Finke, D., U. G. Brinckmann, V. ter Meulen, and U. G. Liebert 1995. Gamma interferon is a major mediator of antiviral defense in experimental measles virus-induced encephalitis *J Virol* **69**:5469-74.

Frei, K., U. V. Malipiero, T. P. Leist, R. M. Zinkernagel, M. E. Schwab, and A. Fontana 1989. On the cellular source and function of interleukin 6 produced in the central nervous system in viral diseases *Eur J Immunol.* **19**:689-94.

Fujii, N., K. Oguma, K. Kimura, T. Yamashita, S. Ishida, K. Fujinaga, and T. Yashiki 1988. Oligo-2',5'-adenylate synthetase activity in K562 cell lines persistently infected with measles or mumps virus *J Gen Virol.* **69**:2085-91.

Fujinami, R. S., and M. B. Oldstone 1980. Alterations in expression of measles virus polypeptides by antibody: molecular events in antibody-induced antigenic modulation *J Immunol.* **125**:78-85.

Fujisawa, R., F. J. McAtee, K. Wehrly, and J. L. Portis 1998. The neuroinvasiveness of a murine retrovirus is influenced by a dileucine-containing sequence in the cytoplasmic tail of glycosylated Gag *J Virol.* **72**:5619-25.

Fulginiti, V. A., and C. H. Kempe 1965. A comparison of measles neutralizing and hemagglutination-inhibition antibody titers in individual sera *Am J Epidemiol.* **82**:135-42.

Ghali, M., 1998. Dissertation, Molekulare Aspekte Masernvirus-induzierter Zytokinexpression in Gehirnzellen.

Garenne, M., O. Leroy, J. P. Beau, and I. Sene 1991. Child mortality after high-titre measles vaccines: prospective study in Senegal *Lancet.* **338**:903-7.

Gerlier, D., B. Loveland, G. Varior-Krishnan, B. Thorley, I. F. McKenzie, and C. Rabourdin-Combe 1994. Measles virus receptor properties are shared by several CD46 isoforms differing in extracellular regions and cytoplasmic tails *J Gen Virol.* **75**:2163-71.

- Gerlier, D., G. Varior-Krishnan, and P. Devaux** 1995. CD46-mediated measles virus entry: a first key to host-range specificity *Trends Microbiol.* **3**:338-45.
- Gibbs, E. P., Gibbs, E. L., Carpenter, P. R., Spies, H. W.** 1959. Encephalographic abnormality in "uncomplicated" childhood diseases *JAMA* **171**:1050-1055
- Gogate, N., M. Bakht, K. Kristensson, E. Norrby, and T. Olsson** 1991. Gamma interferon expression and major histocompatibility complex induction during measles and vesicular stomatitis virus infections of the brain *J Neuroimmunol.* **31**:19-26.
- Gogate, N., P. Swoveland, T. Yamabe, L. Verma, J. Woyciechowska, E. Tarnowska-Dziduszko, J. Dymecki, and S. Dhib-Jalbut** 1996. Major histocompatibility complex class I expression on neurons in subacute sclerosing panencephalitis and experimental subacute measles encephalitis *J Neuropathol Exp Neurol.* **55**:435-43.
- Good, RA, Zak, SJ,** 1956, Disturbances in gammaglobulin synthesis as „experiments of nature.“ *Pediatrics,* **46**: 30-32
- Graves, M., D. E. Griffin, R. T. Johnson, R. L. Hirsch, I. L. de Soriano, S. Roedenbeck, and A. Vaisberg** 1984. Development of antibody to measles virus polypeptides during complicated and uncomplicated measles virus infections *J Virol.* **49**:409-12.
- Greene, L. A., and A. S. Tischler** 1976. Establishment of a noradrenergic clonal line of rat adrenal pheochromocytoma cells which respond to nerve growth factor *Proc Natl Acad Sci U S A.* **73**:2424-8.
- Greiffenberg, L., W. Goebel, K. S. Kim, I. Weiglein, A. Bubert, F. Engelbrecht, M. Stins, and M. Kuhn** 1998. Interaction of *Listeria monocytogenes* with human brain microvascular endothelial cells: InlB-dependent invasion, long-term intracellular growth, and spread from macrophages to endothelial cells *Infect Immun.* **66**:5260-7.
- Griffin, D. E.** 1995. Immune responses during measles virus infection *Curr Top Microbiol Immunol.* **191**:117-34.
- Griffin, D. E., and B. J. Ward** 1993. Differential CD4 T cell activation in measles *J Infect Dis.* **168**:275-81.
- Griffin, D. E., B. J. Ward, E. Jauregui, R. T. Johnson, and A. Vaisberg** 1990. Immune activation during measles: interferon-gamma and neopterin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease *J Infect Dis.* **161**:449-53.
- Griffin, D. E., B. J. Ward, E. Jauregui, R. T. Johnson, and A. Vaisberg** 1989. Immune activation in measles *N Engl J Med.* **320**:1667-72.
- Griffin, D. E., B. J. Ward, E. Jauregui, R. T. Johnson, and A. Vaisberg** 1990. Natural killer cell activity during measles *Clin Exp Immunol.* **81**:218-24.
- Griffin, D. E., B. J. Ward, E. Juaregui, R. T. Johnson, and A. Vaisberg** 1992. Immune activation during measles: beta 2-microglobulin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease *J Infect Dis.* **166**:1170-3.

Griffin, D. E., J. Mullinix, O. Narayan, and R. T. Johnson 1974. Age dependence of viral expression: comparative pathogenesis of two rodent-adapted strains of measles virus in mice *Infect Immun.* **9**:690-5.

Griffin, DE, Bellini, WJ, 1996, Measles Virus. In: Fields, BN, Knipe, PM, Howley, PM et al. (eds), *Fields' Virology*, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1267-1311

Griffin, DE, Ward, BJ, Jauregui, E, Johnson, RT, Vaisberg, A, 1990a, Natural killer cell activity during measles. *Clin Exp Immunol.* **81**:218-224

Griffin, DE, Ward, BJ, Jauregui, E, Johnson, RT, Vaisberg, A, 1990b, Immune activation during measles: interferon-gamma and neopterin in plasma and cerebrospinal fluid in complicated and uncomplicated disease. *J Infect Dis.* **161**:449-453

Hanninen, P., P. Arstila, H. Lang, A. Salmi, and M. Panelius 1980. Involvement of the central nervous system in acute, uncomplicated measles virus infection *J Clin Microbiol.* **11**:610-3.

Hiramatsu, K., M. Tadano, R. Men, and C. J. Lai 1996. Mutational analysis of a neutralization epitope on the dengue type 2 virus (DEN2) envelope protein: monoclonal antibody resistant DEN2/DEN4 chimeras exhibit reduced mouse neurovirulence *Virology.* **224**:437-45.

Hofman FM, Hinton DR, Baemayr J, Weil M, Merrill JE 1991. Lymphokines and immunoregulatory molecules in subacute sclerosing panencephalitis. *Clin Immunol Immunopathol.* **58**:331-42.

Holzmann, H., K. Stiasny, M. Ecker, C. Kunz, and F. X. Heinz 1997. Characterization of monoclonal antibody-escape mutants of tick-borne encephalitis virus with reduced neuroinvasiveness in mice *J Gen Virol.* **78**:31-7.

Hsu, E. C., C. Iorio, F. Sarangi, A. A. Khine, and C. D. Richardson 2001. CDw150(SLAMF7) is a receptor for a lymphotropic strain of measles virus and may account for the immunosuppressive properties of this virus *Virology.* **279**:9-21.

Hu, A., J. Kovamees, and E. Norrby 1994. Intracellular processing and antigenic maturation of measles virus hemagglutinin protein *Arch Virol.* **136**:239-53.

Hu, A., R. Cattaneo, S. Schwartz, and E. Norrby 1994. Role of N-linked oligosaccharide chains in the processing and antigenicity of measles virus haemagglutinin protein *J Gen Virol.* **75**:1043-52.

Hu, A., T. Cathomen, R. Cattaneo, and E. Norrby 1995. Influence of N-linked oligosaccharide chains on the processing, cell surface expression and function of the measles virus fusion protein *J Gen Virol.* **76**:705-10.

Hummel, K. B., and W. J. Bellini 1995. Localization of monoclonal antibody epitopes and functional domains in the hemagglutinin protein of measles virus *J Virol.* **69**:1913-6.

- Iwasaki, Y., and H. Koprowski** 1974. Cell to cell transmission of virus in the central nervous system. I. Subacute sclerosing panencephalitis *Lab Invest.* **31**:187-96.
- Jabbour, J. T., D. A. Duenas, J. L. Sever, H. M. Krebs, and L. Horta-Barbosa** 1972. Epidemiology of subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). A report of the SSPE registry *Jama.* **220**:959-62.
- Jahnke, U., E. H. Fischer, and E. C. Alvord, Jr.** 1985. Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis *Science.* **229**:282-4.
- Jiang, W. R., A. Lowe, S. Higgs, H. Reid, and E. A. Gould** 1993. Single amino acid codon changes detected in louping ill virus antibody-resistant mutants with reduced neurovirulence *J Gen Virol.* **74**:931-5.
- Johnson, R. T.** 1982. Viruses and chronic neurological diseases *Johns Hopkins Med J.* **150**:132-40.
- Johnstone, R. W., S. M. Russell, B. E. Loveland, and I. F. McKenzie** 1993. Polymorphic expression of CD46 protein isoforms due to tissue-specific RNA splicing *Mol Immunol.* **30**:1231-41.
- Joncas, J. H., L. R. Robillard, A. Boudreault, M. Leyritz, and B. J. McLaughlin** 1976. Letter: Interferon in serum and cerebrospinal fluid in subacute sclerosing panencephalitis *Can Med Assoc J.* **115**:309.
- Karp, C. L., M. Wysocka, L. M. Wahl, J. M. Ahearn, P. J. Cuomo, B. Sherry, G. Trinchieri, and D. E. Griffin** 1996. Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus *Science.* **273**:228-31.
- Kawano, H., V. Rostapshov, L. Rosen, and C. J. Lai** 1993. Genetic determinants of dengue type 4 virus neurovirulence for mice *J Virol.* **67**:6567-75.
- Khuth, S. T., H. Akaoka, A. Pagenstecher, O. Verlaeten, M. F. Belin, P. Giraudon, and A. Bernard** 2001. Morbillivirus infection of the mouse central nervous system induces region-specific upregulation of MMPs and TIMPs correlated to inflammatory cytokine expression *J Virol.* **75**:8268-82.
- Kirk, J., A. L. Zhou, S. McQuaid, S. L. Cosby, and I. V. Allen** 1991. Cerebral endothelial cell infection by measles virus in subacute sclerosing panencephalitis: ultrastructural and in situ hybridization evidence *Neuropathol Appl Neurobiol.* **17**:289-97.
- Kornfeld, R., and S. Kornfeld** 1985. Assembly of asparagine-linked oligosaccharides *Annu Rev Biochem.* **54**:631-64.
- Kovamees, J., R. Rydbeck, C. Orvell, and E. Norrby** 1990. Hemagglutinin-neuraminidase (HN) amino acid alterations in neutralization escape mutants of Kilham mumps virus *Virus Res.* **17**:119-29.
- Krantic, S., C. Gimenez, and C. Rabourdin-Combe** 1995. Cell-to-cell contact via measles virus haemagglutinin-CD46 interaction triggers CD46 downregulation *J Gen Virol.* **76**:2793-800.

- Kristensson, K.** 1996. Sorting signals and targeting of infectious agents through axons: an annotation to the 100 years' birth of the name "axon" *Brain Res Bull.* **41**:327-33.
- Kumanashi T.** 1967. Brain tumor induced with Rous Sarkoma Virus, Schmidt-Ruppin strain I induction of brain tumors in adult mice with Rous chicken sarcoma cells. *Jap. J. Exp. Med.* **37**: 461-474
- Kumanishi, T., and S. In** 1979. SSPE: immunohistochemical demonstration of measles virus antigen(s) in paraffin sections *Acta Neuropathol (Berl).* **48**:161-3.
- Laemmli, U.K.** 1970. Cleavage of structural proteins during assembly of the head of the bacteriophage T4 *Nature* **227**:680-685
- Langedijk, J. P., F. J. Daus, and J. T. van Oirschot** 1997. Sequence and structure alignment of Paramyxoviridae attachment proteins and discovery of enzymatic activity for a morbillivirus hemagglutinin *J Virol.* **71**:6155-67.
- Lawrence, D. M., C. E. Patterson, T. L. Gales, J. L. D'Orazio, M. M. Vaughn, and G. F. Rall** 2000. Measles virus spread between neurons requires cell contact but not CD46 expression, syncytium formation, or extracellular virus production *J Virol.* **74**:1908-18.
- Lawrence, D. M., M. M. Vaughn, A. R. Belman, J. S. Cole, and G. F. Rall** 1999. Immune response-mediated protection of adult but not neonatal mice from neuron-restricted measles virus infection and central nervous system disease *J Virol.* **73**:1795-801.
- Li, S., J. Schulman, S. Itamura, and P. Palese** 1993. Glycosylation of neuraminidase determines the neurovirulence of influenza A/WSN/33 virus *J Virol.* **67**:6667-73.
- Lieberman, A. P., P. M. Pitha, H. S. Shin, and M. L. Shin** 1989. Production of tumor necrosis factor and other cytokines by astrocytes stimulated with lipopolysaccharide or a neurotropic virus *Proc Natl Acad Sci U S A.* **86**:6348-52.
- Liebert, U. G., and V. ter Meulen** 1987. Virological aspects of measles virus-induced encephalomyelitis in Lewis and BN rats *J Gen Virol.* **68**:1715-22.
- Liebert, U. G., S. G. Flanagan, S. Loffler, K. Baczko, V. ter Meulen, and B. K. Rima** 1994. Antigenic determinants of measles virus hemagglutinin associated with neurovirulence *J Virol.* **68**:1486-93.
- Liebert, U. G., S. Schneider-Schaulies, K. Baczko, and V. ter Meulen** 1990. Antibody-induced restriction of viral gene expression in measles encephalitis in rats *J Virol.* **64**:706-13.
- Liszewski, M. K., I. Tedja, and J. P. Atkinson** 1994. Membrane cofactor protein (CD46) of complement. Processing differences related to alternatively spliced cytoplasmic domains *J Biol Chem.* **269**:10776-9.
- Liszewski, M. K., T. W. Post, and J. P. Atkinson** 1991. Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster *Annu Rev Immunol.* **9**:431-55.

Loveland, B. E., R. W. Johnstone, S. M. Russell, B. R. Thorley, and I. F. McKenzie 1993. Different membrane cofactor protein (CD46) isoforms protect transfected cells against antibody and complement mediated lysis *Transpl Immunol.* **1**:101-8.

Lynch, W. P., and A. H. Sharpe 2000. Differential glycosylation of the Cas-Br-E env protein is associated with retrovirus-induced spongiform neurodegeneration *J Virol.* **74**:1558-65.

Maisner, A., J. Schneider-Schaulies, M. K. Liszewski, J. P. Atkinson, and G. Herrler 1994. Binding of measles virus to membrane cofactor protein (CD46): importance of disulfide bonds and N-glycans for the receptor function *J Virol.* **68**:6299-304.

Malvoisin, E., and T. F. Wild 1993. Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins *J Gen Virol.* **74**:2365-72.

Manchester, M., and G. F. Rall 2001. Model Systems: transgenic mouse models for measles pathogenesis *Trends Microbiol.* **9**:19-23.

Manchester, M., D. S. Eto, and M. B. Oldstone 1999. Characterization of the inflammatory response during acute measles encephalitis in NSE-CD46 transgenic mice *J Neuroimmunol.* **96**:207-17.

Manchester, M., M. K. Liszewski, J. P. Atkinson, and M. B. Oldstone 1994. Multiple isoforms of CD46 (membrane cofactor protein) serve as receptors for measles virus *Proc Natl Acad Sci U S A.* **91**:2161-5.

Mathiesen, T., L. Hammarstrom, E. Fridell, A. Linde, G. Wirsen, C. I. Smith, E. Norrby, and B. Wahren 1990. Aberrant IgG subclass distribution to measles in healthy seropositive individuals, in patients with SSPE and in immunoglobulin-deficient patients *Clin Exp Immunol.* **80**:202-5.

Matloubian, M., T. Somasundaram, S. R. Kolhekar, R. Selvakumar, and R. Ahmed 1990. Genetic basis of viral persistence: single amino acid change in the viral glycoprotein affects ability of lymphocytic choriomeningitis virus to persist in adult mice *J Exp Med.* **172**:1043-8.

Mavaddat, N., D. W. Mason, P. D. Atkinson, E. J. Evans, R. J. Gilbert, D. I. Stuart, J. A. Fennelly, A. N. Barclay, S. J. Davis, and M. H. Brown 2000. Signaling lymphocytic activation molecule (CDw150) is homophilic but self-associates with very low affinity *J Biol Chem.* **275**:28100-9.

McNeill, WH, 1976, *Plaques and People.* Garden City, NJ, Anchor Press/Doubleday, 329

McQuaid, S., and S. L. Cosby 2002. An Immunohistochemical Study of the Distribution of the Measles Virus Receptors, CD46 and SLAM, in Normal Human Tissues and Subacute Sclerosing Panencephalitis *Lab Invest.* **82**:403-9.

McQuaid, S., J. Kirk, A. L. Zhou, and I. V. Allen 1993. Measles virus infection of cells in perivascular infiltrates in the brain in subacute sclerosing panencephalitis: confirmation by non-radioactive in situ hybridization, immunocytochemistry and electron microscopy *Acta Neuropathol.* **85**:154-8.

McQuaid, S., R. Campbell, S. Isserte, and S. L. Cosby 1997. Leukaemia inhibitory factor mRNA is expressed in the brains of patients with subacute sclerosing panencephalitis *J Neuroimmunol.* **77**:57-62.

Menezes, J., W. Leibold, G. Klein, and G. Clements 1975. Establishment and characterization of an Epstein-Barr virus (EBV)- negative lymphoblastoid B cell line (BJA-B) from an exceptional, EBV- genome-negative African Burkitt's lymphoma *Biomedicine.* **22**:276-84.

Merrill, J. E., and I. S. Chen 1991. HIV-1, macrophages, glial cells, and cytokines in AIDS nervous system disease *Faseb J.* **5**:2391-7.

Miller, C. A., and C. S. Raine 1979. Heterogeneity of virus particles in measles virus *J Gen Virol.* **45**:441-53.

Mims, C. A. 1989. The pathogenetic basis of viral tropism *Am J Pathol.* **135**:447-55.

Modlin, J. F., J. T. Jabbour, J. J. Witte, and N. A. Halsey 1977. Epidemiologic studies of measles, measles vaccine, and subacute sclerosing panencephalitis *Pediatrics.* **59**:505-12.

Moeller, K., I. Duffy, P. Duprex, B. Rima, R. Beschorner, S. Fauser, R. Meyermann, S. Niewiesk, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies 2001. Recombinant measles viruses expressing altered hemagglutinin (H) genes: functional separation of mutations determining H antibody escape from neurovirulence *J Virol.* **75**:7612-20.

Moench, T. R., D. E. Griffin, C. R. Obriecht, A. J. Vaisberg, and R. T. Johnson 1988. Acute measles in patients with and without neurological involvement: distribution of measles virus antigen and RNA *J Infect Dis.* **158**:433-42.

Moskophidis, D., K. Frei, J. Lohler, A. Fontana, and R. M. Zinkernagel 1991. Production of random classes of immunoglobulins in brain tissue during persistent viral infection paralleled by secretion of interleukin-6 (IL- 6) but not IL-4, IL-5, and gamma interferon *J Virol.* **65**:1364-9.

Mrkic, B., J. Pavlovic, T. Rulicke, P. Volpe, C. J. Buchholz, D. Hourcade, J. P. Atkinson, A. Aguzzi, and R. Cattaneo 1998. Measles virus spread and pathogenesis in genetically modified mice *J Virol.* **72**:7420-7.

Mustafa, M. M., S. D. Weitman, N. J. Winick, W. J. Bellini, C. F. Timmons, and J. D. Siegel 1993. Subacute measles encephalitis in the young immunocompromised host: report of two cases diagnosed by polymerase chain reaction and treated with ribavirin and review of the literature *Clin Infect Dis.* **16**:654-60.

Muylaert, I. R., T. J. Chambers, R. Galler, and C. M. Rice 1996. Mutagenesis of the N-linked glycosylation sites of the yellow fever virus NS1 protein: effects on virus replication and mouse neurovirulence *Virology.* **222**:159-68.

Naniche, D., G. Varior-Krishnan, F. Cervoni, T. F. Wild, B. Rossi, C. Raboridin-Combe, and D. Gerlier 1993. Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus *J Virol.* **67**:6025-32.

- Ni, H., and A. D. Barrett** 1998. Attenuation of Japanese encephalitis virus by selection of its mouse brain membrane receptor preparation escape variants *Virology*. **241**:30-6.
- Nichols, K. E.** 2000. X-linked lymphoproliferative disease: genetics and biochemistry *Rev Immunogenet.* **2**:256-66.
- Niewiesk, S.** 1999. Cotton rats (*Sigmodon hispidus*): an animal model to study the pathogenesis of measles virus infection *Immunol Lett.* **65**:47-50.
- Niewiesk, S., J. Schneider-Schaulies, H. Ohnibus, C. Jassoy, S. Schneider-Schaulies, L. Diamond, J. S. Logan, and V. ter Meulen** 1997. CD46 expression does not overcome the intracellular block of measles virus replication in transgenic rats *J Virol.* **71**:7969-73.
- Niewiesk, S., U. Brinckmann, B. Bankamp, S. Sirak, U. G. Liebert, and V. ter Meulen** 1993. Susceptibility to measles virus-induced encephalitis in mice correlates with impaired antigen presentation to cytotoxic T lymphocytes *J Virol.* **67**:75-81.
- Norrby, E., and K. Kristensson** 1997. Measles virus in the brain *Brain Res Bull.* **44**:213-20.
- Nottet, H. S., D. R. Bar, H. van Hassel, J. Verhoef, and L. A. Boven** 1997. Cellular aspects of HIV-1 infection of macrophages leading to neuronal dysfunction in in vitro models for HIV-1 encephalitis *J Leukoc Biol.* **62**:107-16.
- Ohgimoto, S., K. Ohgimoto, S. Niewiesk, I. M. Klagge, J. Pfeuffer, I. C. Johnston, J. Schneider-Schaulies, A. Weidmann, V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies** 2001. The haemagglutinin protein is an important determinant of measles virus tropism for dendritic cells in vitro *J Gen Virol.* **82**:1835-44.
- Oldstone** 1997. A transgenic mouse model for measles virus infection of the brain *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:4659-63.
- Oldstone** 1997. A transgenic mouse model for measles virus infection of the brain *Proc Natl Acad Sci U S A.* **94**:4659-63.
- Oldstone, M. B., H. Lewicki, D. Thomas, A. Tishon, S. Dales, J. Patterson, M. Manchester, D. Homann, D. Nanche, and A. Holz** 1999. Measles virus infection in a transgenic model: virus-induced immunosuppression and central nervous system disease *Cell.* **98**:629-40.
- Ono, N., H. Tatsuo, K. Tanaka, H. Minagawa, and Y. Yanagi** 2001. V domain of human SLAM (CDw150) is essential for its function as a measles virus receptor *J Virol.* **75**:1594-600.
- Panum, P.** 1938, Observations made during the epidemic of Measles on the Faroe Islands in the year 1846. *Med Classics.* **3**: 829-886
- Patterson, J. B., D. Thomas, H. Lewicki, M. A. Billeter, and M. B. Oldstone** 2000. V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo *Virology.* **267**:80-9.

Patterson, J. B., F. Scheiflinger, M. Manchester, T. Yilma, and M. B. Oldstone 1999. Structural and functional studies of the measles virus hemagglutinin: identification of a novel site required for CD46 interaction *Virology*. **256**:142-51.

Patterson, J. B., M. Manchester, and M. B. Oldstone 2001. Disease model: dissecting the pathogenesis of the measles virus *Trends Mol Med*. **7**:85-8.

Patterson, J. B., T. I. Cornu, J. Redwine, S. Dales, H. Lewicki, A. Holz, D. Thomas, M. A. Billeter, and M. B. Oldstone 2001. Evidence that the hypermutated M protein of a subacute sclerosing panencephalitis measles virus actively contributes to the chronic progressive CNS disease *Virology*. **291**:215-25.

Patterson, P. H., and M. J. Fann 1992. Further studies of the distribution of CDF/LIF mRNA *Ciba Found Symp*. **167**:125-35.

Paula-Barbosa, M. M., and C. Cruz 1981. Nerve cell fusion in a case of subacute sclerosing panencephalitis *Ann Neurol*. **9**:400-3.

Petralli, JK, Merigan, TC, Wilbur, JR, 1965, Circulating interferon after measles vaccination. *N Engl J Med*. **273**: 198-201

Plumb, J., W. P. Duprex, C. H. Cameron, C. Richter-Landsberg, P. Talbot, and S. McQuaid 2002. Infection of human oligodendrogloma cells by a recombinant measles virus expressing enhanced green fluorescent protein *J Neurovirol*. **8**:24-34.

Polacino, P. S., L. M. Pinchuk, S. P. Sidorenko, and E. A. Clark 1996. Immunodeficiency virus cDNA synthesis in resting T lymphocytes is regulated by T cell activation signals and dendritic cells *J Med Primatol*. **25**:201-9.

Polack, F. P., S. J. Hoffman, W. J. Moss, and D. E. Griffin 2002. Altered synthesis of interleukin-12 and type 1 and type 2 cytokines in rhesus macaques during measles and atypical measles *J Infect Dis*. **185**:13-9.

Portis, J. L., G. J. Spangrude, and F. J. McAtee 1994. Identification of a sequence in the unique 5' open reading frame of the gene encoding glycosylated Gag which influences the incubation period of neurodegenerative disease induced by a murine retrovirus *J Virol*. **68**:3879-87.

Portis, J. L., R. Fujisawa, and F. J. McAtee 1996. The glycosylated gag protein of MuLV is a determinant of neuroinvasiveness: analysis of second site revertants of a mutant MuLV lacking expression of this protein *Virology*. **226**:384-92.

Punnonen, J., B. G. Cocks, J. M. Carballido, B. Bennett, D. Peterson, G. Aversa, and J. E. de Vries 1997. Soluble and membrane-bound forms of signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) induce proliferation and Ig synthesis by activated human B lymphocytes *J Exp Med*. **185**:993-1004.

Radecke, F., P. Spielhofer, H. Schneider, K. Kaelin, M. Huber, C. Dotsch, G. Christiansen, and M. A. Billeter 1995. Rescue of measles viruses from cloned DNA *Embo J*. **14**:5773-84.

Rademacher, T. W., R. B. Parekh, and R. A. Dwek 1988. Glycobiology Annu Rev Biochem. **57**:785-838.

Rall, G. F., M. Manchester, L. R. Daniels, E. M. Callahan, A. R. Belman, and M. B. Oldstone 1997. A transgenic mouse model for measles virus infection of the brain Proc Natl Acad Sci U S A. **94**:4659-63.

Rey, F. A., F. X. Heinz, C. Mandl, C. Kunz, and S. C. Harrison 1995. The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution Nature. **375**:291-8.

Richardson, C. D., and P. W. Choppin 1983. Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: studies on the site of action Virology. **131**:518-32.

Richardson, C., D. Hull, P. Greer, K. Hasel, A. Berkovich, G. Englund, W. Bellini, B. Rima, and R. Lazzarini 1986. The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): a comparison of fusion proteins from several different paramyxoviruses Virology. **155**:508-23.

Riley, E. C., G. Murphy, and R. L. Riley 1978. Airborne spread of measles in a suburban elementary school Am J Epidemiol. **107**:421-32.

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

Ringheim, G. E., K. L. Burgher, and J. A. Heroux 1995. Interleukin-6 mRNA expression by cortical neurons in culture: evidence for neuronal sources of interleukin-6 production in the brain J Neuroimmunol. **63**:113-23.

Ruckle, G. and Rogers, KD 1957. Studies with measles virus II. Isolation of virus and immunological studies in persons who have had natural disease J Immunol. **78**:341-355.

Russel, R, Paterson, RG, Lamb, RA, 1994. Studies with cross-linking reagents on the oligomeric form of the paramyxovirus fusion protein. Virology **199**:160-168

Saiki, R. K., D. H. Gelfand, S. Stoffel, S. J. Scharf, R. Higuchi, G. T. Horn, K. B. Mullis, and H. A. Erlich 1988. Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase Science. **239**:487-91.

Sambrook, J., Maniatis, T. and Fritsch, E. F. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual Cold Spring Harbour, Laboratory Press, Cold Spring Harbour, New York

Sanger, F., S. Nicklen, and A. R. Coulson 1977. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors Proc Natl Acad Sci U S A. **74**:5463-7.

Sayos, J., C. Wu, M. Morra, N. Wang, X. Zhang, D. Allen, S. van Schaik, L. Notarangelo, R. Geha, M. G. Roncarolo, H. Oettgen, J. E. De Vries, G. Aversa, and C. Terhorst 1998. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM Nature. **395**:462-9.

Schmid, A., P. Spielhofer, R. Cattaneo, K. Baczko, V. ter Meulen, and M. A. Billeter 1992. Subacute sclerosing panencephalitis is typically characterized by alterations in the fusion protein cytoplasmic domain of the persisting measles virus *Virology*. **188**:910-5.

Schneider-Schaulies, J. 2000. Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis *J Gen Virol*. **81**:1413-29.

Schneider-Schaulies, J., J. J. Schnorr, U. Brinckmann, L. M. Dunster, K. Baczko, U. G. Liebert, S. Schneider-Schaulies, and V. ter Meulen 1995. Receptor usage and differential downregulation of CD46 by measles virus wild-type and vaccine strains *Proc Natl Acad Sci U S A*. **92**:3943-7.

Schneider-Schaulies, J., L. M. Dunster, F. Kobune, B. Rima, and V. ter Meulen 1995. Differential downregulation of CD46 by measles virus strains *J Virol*. **69**:7257-9.

Schneider-Schaulies, J., S. Schneider-Schaulies, and V. Ter Meulen 1993. Differential induction of cytokines by primary and persistent measles virus infections in human glial cells *Virology*. **195**:219-28.

Schneider-Schaulies, S., J. Schneider-Schaulies, M. Bayer, S. Loffler, and V. ter Meulen 1993. Spontaneous and differentiation-dependent regulation of measles virus gene expression in human glial cells *J Virol*. **67**:3375-83.

Schneider-Schaulies, S., S. Niewiesk, J. Schneider-Schaulies, and V. ter Meulen 2001. Measles virus induced immunosuppression: targets and effector mechanisms *Curr Mol Med*. **1**:163-81.

Schneider-Schaulies, S., U. G. Liebert, K. Baczko, and V. ter Meulen 1990. Restricted expression of measles virus in primary rat astroglial cells *Virology*. **177**:802-6.

Schneider-Schaulies, S., U. G. Liebert, Y. Segev, B. Rager-Zisman, M. Wolfson, and V. ter Meulen 1992. Antibody-dependent transcriptional regulation of measles virus in persistently infected neural cells *J Virol*. **66**:5534-41.

Schnorr, J. J., F. T. Cutts, J. G. Wheeler, S. M. Akramuzzaman, M. S. Alam, T. Azim, S. Schneider-Schaulies, and V. ter-Meulen 2001. Immune modulation after measles vaccination of 6-9 months old Bangladeshi infants *Vaccine*. **19**:1503-10.

Schnorr, J. J., M. Seufert, J. Schlender, J. Borst, I. C. Johnston, V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies 1997. Cell cycle arrest rather than apoptosis is associated with measles virus contact-mediated immunosuppression in vitro *J Gen Virol*. **78**:3217-26.

Schnorr, J. J., S. Xanthakos, P. Keikavoussi, E. Kampgen, V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies 1997. Induction of maturation of human blood dendritic cell precursors by measles virus is associated with immunosuppression *Proc Natl Acad Sci U S A*. **94**:5326-31.

Schobitz, B., D. A. Voorhuis, and E. R. De Kloet 1992. Localization of interleukin 6 mRNA and interleukin 6 receptor mRNA in rat brain *Neurosci Lett*. **136**:189-92.

Schobitz, B., M. Van Den Dobbelsteen, F. Holsboer, W. Sutanto, and E. R. De Kloet 1993. Regulation of interleukin 6 gene expression in rat *Endocrinology*. **132**:1569-76.

Seif, I., P. Coulon, P. E. Rollin, and A. Flamand 1985. Rabies virulence: effect on pathogenicity and sequence characterization of rabies virus mutations affecting antigenic site III of the glycoprotein *J Virol*. **53**:926-34.

Seya, T., T. Hara, M. Matsumoto, Y. Sugita, and H. Akedo 1990. Complement-mediated tumor cell damage induced by antibodies against membrane cofactor protein (MCP, CD46) *J Exp Med*. **172**:1673-80.

Shiozawa, S., N. Yoshikawa, K. Iijima, and K. Negishi 1988. A sensitive radioimmunoassay for circulating alpha-interferon in the plasma of healthy children and patients with measles virus infection *Clin Exp Immunol*. **73**:366-9.

Stark, GR, Kerr, IM, Williams, BRG, Silverman, RH, Schreiber, RD, 1998, How cells respond to interferons. *Annu Rev Biochem*. **67**:227-264

Stiasny, K., S. L. Allison, A. Marchler-Bauer, C. Kunz, and F. X. Heinz 1996. Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus *J Virol*. **70**:8142-7.

Suryanarayana, K., K. Bacsko, V. ter Meulen, and R. R. Wagner 1994. Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue *J Virol*. **68**:1532-43.

Tanaka, K., H. Minagawa, M. F. Xie, and Y. Yanagi 2002. The measles virus hemagglutinin downregulates the cellular receptor SLAM (CD150) *Arch Virol*. **147**:195-203.

Tatsuo, H., N. Ono, K. Tanaka, and Y. Yanagi 2000. SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus *Nature*. **406**:893-7.

Tilles, J. G., F. Balkwill, and J. Davilla 1987. 2',5'-Oligoadenylate synthetase and interferon in peripheral blood after rubella, measles, or mumps live virus vaccine *Proc Soc Exp Biol Med*. **186**:70-4.

Towbin, H., T. Staehelin, and J. Gordon 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications *Proc Natl Acad Sci U S A*. **76**:4350-4.

Tumilowicz, J. J., W. W. Nichols, J. J. Cholon, and A. E. Greene 1970. Definition of a continuous human cell line derived from neuroblastoma *Cancer Res*. **30**:2110-8.

Urbanska, E. M., B. J. Chambers, H. G. Ljunggren, E. Norrby, and K. Kristensson 1997. Spread of measles virus through axonal pathways into limbic structures in the brain of TAP1 *-/-* mice *J Med Virol*. **52**:362-9.

van Binnendijk, R. S., M. C. Poelen, K. C. Kuijpers, A. D. Osterhaus, and F. G. Uytdehaag 1990. The predominance of CD8+ T cells after infection with measles virus suggests a role for CD8+ class I MHC-restricted cytotoxic T lymphocytes (CTL) in recovery from measles. Clonal analyses of human CD8+ class I MHC-restricted CTL *J Immunol.* **144**:2394-9.

Van Damme, J., M. R. Schaafsma, W. E. Fibbe, J. H. Falkenburg, G. Opendakker, and A. Billiau 1989. Simultaneous production of interleukin 6, interferon-beta and colony-stimulating activity by fibroblasts after viral and bacterial infection *Eur J Immunol.* **19**:163-8.

Varior-Krishnan, G., M. C. Trescol-Biemont, D. Naniche, C. Roubourdin-Combe, and D. Gerlier 1994. Glycosyl-phosphatidylinositol-anchored and transmembrane forms of CD46 display similar measles virus receptor properties: virus binding, fusion, and replication; down-regulation by hemagglutinin; and virus uptake and endocytosis for antigen presentation by major histocompatibility complex class II molecules *J Virol.* **68**:7891-9.

Varsanyi, T. M., G. Utter, and E. Norrby 1984. Purification, morphology and antigenic characterization of measles virus envelope components *J Gen Virol.* **65**:355-66.

von Pirquet, C. 1908. Das Verhalten der kutanen Tuberkulinreaktion während der Masern. *Dtsch Med Wochenschr.* **30**:1297-1300

Vucenovic, V., and D. Vranjesevic 1989. SSPE-epidemiology and measles vaccination: our cases *Neurologija.* **38**:23-31.

Wang, Z., L. Hangartner, T. I. Cornu, L. R. Martin, A. Zuniga, M. A. Billeter, and H. Y. Naim 2001. Recombinant measles viruses expressing heterologous antigens of mumps and simian immunodeficiency viruses *Vaccine.* **19**:2329-36.

Ward, A. C. 1996. Neurovirulence of influenza A virus *J Neurovirol.* **2**:139-51.

Weissbrich, B., J. Schneider-Schaulies, and Volker ter Meulen, 2001: Measles and its neurological complications, in *Clinical Neurovirology*

Wild, T. F., E. Malvoisin, and R. Buckland 1991. Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion *J Gen Virol.* **72**:439-42.

Wyatt, H. V. 1976. Is poliomyelitis an auto-allergic disease triggered by virus? *Med Hypotheses.* **2**:262-8.

Wyde, P. R., M. W. Ambrose, T. G. Voss, H. L. Meyer, and B. E. Gilbert 1992. Measles virus replication in lungs of hispid cotton rats after intranasal inoculation *Proc Soc Exp Biol Med.* **201**:80-7.

Yamabe, T., G. Dhir, E. P. Cowan, A. L. Wolf, G. K. Bergey, A. Krumholz, E. Barry, P. M. Hoffman, and S. Dhib-Jalbut 1994. Cytokine-gene expression in measles-infected adult human glial cells *J Neuroimmunol.* **49**:171-9.

8 Abkürzungen

a.dest	destilliertes Wasser
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
APS	Ammoniumpersulfat
As	Aminosäure
BJABpEdm	persistierend mit Edm infizierte BJAB-Zellen
BJABpWTFb	persistierend mit WTFb infizierte BJAB-Zellen
bp	Basenpaare
BSA	bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
°C	Grad Celsius
ca.	circa
Ca ²⁺	2-wertiges Calciumion
ConA	Concanavalin A
CPE	zytopathischer Effekt
Da	Dalton
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
dpi	Tage nach Infektion (days post infection)
DTT	Dithiothreiol
ECL	enhanced chemiluminescence
Edm	Edmonston (MV-Vakzine)

EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ER	Endoplasmatisches Retikulum
EtOH	Ethanol
F	Fusionsprotein des MV
FACS	fluorescence activated cell scanner; Durchflußzytometer
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat; Fluoreszenzfarbstoff
FKS	fötales Kälberserum
g	Erdbeschleunigung
g	Gramm
g/l	Gramm pro Liter
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
H	Hämagglutininprotein des MV
h	Stunde
HBSS ⁻	Hank's balanced salt solution without Ca ²⁺ /Mg ²⁺
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
i.c.	intrazerebral
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
kb	Kilobasen
kDa	Kilodalton
l	Liter
LIF	Leukemia inhibitory factor
Lsg.	Lösung
m	milli, 10 ⁻³
M	Molar; mol/l
M	Matrixprotein des MV
mAk	monoklonaler Antikörper
MCP	Membran Cofaktor Protein
MEM	Minimal Essential Medium
mfi	mittlere Fluoreszenzintensität
mg	Milligramm
Mg ²⁺	2-wertiges Magnesiumion
μ	mikro, 10 ⁻⁶

µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
ml	Milliliter
mM	millimolar
MG	Molekulargewicht
min	Minute
Min.	Minute
MOI	multiplicity of infection; infektiöse Dosis
MP	Membranproteine
mRNA	messenger-RNA
MV	Masernvirus
n	nano, 10 ⁻⁹
N	Nukleokapsidprotein des MV
ND	not determined
ng	Nanogramm
OD	Optische Dichte
P	Phosphoprotein des MV
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBL	peripheral blood lymphocytes, Periphere Blutlymphozyten
PBMC	peripheral blood mononuclear cells (Periphere Blutmononukleäre Zellen)
PBS	Phosphate buffered saline, Phosphat-gepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PE	Phycoerithrin; Fluoreszenzfarbstoff
PFA	Paraformaldehyd
PFU	plaque forming unit
POX	Peroxidase
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	RPMI 1640 Zellkulturmedium
RT	Raumtemperatur

SDS	sodium dodecylsulfate, Natriumdodecylsulfat
sek	Sekunde
SLAM	signaling lymphocyte activation molecule
SSPE	Subakute sklerosierende Panenzephalitis
Tab.	Tabelle
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TM	Transmembran (-Protein)
TNF	Tumornekrosefaktor
Tris	Tris-hydroxymethyl-Aminomethan
Tris-HCl	Tris-hydroxymethyl-Aminomethan-Hydrochlorid
U	Unit (Enzymeinheit)
ü/N	über Nacht
UV	Ultraviolett
UZ	Ultrazentrifugation
Vol.	Volumen
WB	Western Blot
WT	Wildtyp
WTF	Wildtyp Fleckenstein-Masernvirusstamm
WTFb	WTF, auf BJAB-Zellen passagiertes Isolat
ZNS	Zentrales Nervensystem

9 Lebenslauf

Kerstin Möller
geboren am 17. Dezember 1973
in Bad Hersfeld

Schulbildung:

1980 – 1984 Grundschule in Heringen
1984 – 1986 Förderstufe an der Gesamtschule in Heringen
1986 – 1993 Gymnasialer Zweig der Gesamtschule in Heringen
mit Erwerb der allgemeinen Hochschulreife

Studium:

1993 – 1998 Studium der Biologie an der Universität in Braunschweig
05. September 1995 Vordiplomprüfung
02. Oktober 1998 Diplomprüfung
Hauptfach: Mikrobiologie
Nebenfächer: Genetik und Ökologie

Von Dezember 1997 bis September 1998 Diplomarbeit bei der Gesellschaft für Biotechnologische Forschung in Braunschweig in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. G. S. Chhatwal:

"Isolierung und Charakterisierung eines, für ein sekretiertes Protein codierenden Gens aus Gruppe B-Streptokokken"

Seit Dezember 1998 Promotionsstudium am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg bei PD Dr. J. Schneider-Schaulies:

"Die Bedeutung von Mutationen im Hämagglutinin des Masernvirus für Neurovirulenz und Antikörpererkennung"

10 Veröffentlichungen

Publikationen

Moeller, K., I. Duffy, P. Duprex, B. Rima, R. Beschorner, S. Fauser, R. Meyermann, S. Niewiesk, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies 2001. *Recombinant measles viruses expressing altered hemagglutinin (H) genes: functional separation of mutations determining H antibody escape from neurovirulence* J Virol. 75:7612-20.

Posterpräsentationen

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Wien vom 09. bis 12. März 2000.

Charakterisierung rekombinanter Masernvirus-Hämagglutinin-Austausch- und Antikörper-Escape-Mutanten und Untersuchung ihrer Neurovirulenz

Kerstin Möller, Iain Duffy, Paul Duprex, Volker ter Meulen und Jürgen Schneider-Schaulies

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Dresden vom 14. bis 17. März 2001.

Rekombinante Masernviren mit veränderten Hämagglutinin-Genen: Funktionelle Unterscheidung von Mutationen, die für den Antikörperescape und die Neurovirulenz verantwortlich sind

Möller K., Duffy I., Duprex P., Rima B., ter Meulen V., Niewiesk S. und J. Schneider-Schaulies

Jahrestagung der Gesellschaft für Virologie in Erlangen vom 08. bis 11. April 2002.

Two matching amino acid exchanges in the hemagglutinin gene of measles virus are associated with neurovirulence in Lewis rats

Kerstin Moeller, Iain Duffy, Paul Duprex, Bert Rima, Volker ter Meulen, Stefan Niewiesk and Jürgen Schneider-Schaulies

Abkürzungen

...und das Wichtigste zum Schluss:

die Danksagung!

Meinem Doktorvater Herrn PD Dr. Jürgen Schneider-Schaulies danke ich für die Überlassung des sehr interessanten Themas, für die Betreuung der Doktorarbeit, für die stete Diskussionsbereitschaft und für die schnelle Korrektur dieses Werkes.

Herrn Prof. Dr. Georg Krohne möchte ich für die Übernahme des Zweit-Gutachtens seitens der biologischen Fakultät danken.

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

Bei Herrn PD Dr. Stefan Niewiesk möchte ich mich für die Einarbeitung im Tierstall und für die Arbeit mit meinen Ratten bedanken.

Der gesamten Arbeitsgruppe aus Belfast - Prof. Dr. Bert Rima, Iain, Linda, Martin, Paul, Paula, Uta – danke ich für die herzliche Zusammenarbeit und die nette Betreuung im Labor und in der Freizeit während meines Aufenthaltes in Belfast. Außerdem danke ich Bert, Paul und Iain für die Rekombinanten Viren.

Ganz herzlich möchte ich mich bei meinen Arbeitskollegen – Astrid, Christian, Erik Franziska, Karola, Oliver, Sigi – für die sehr gute und angenehme Arbeitsatmosphäre, die tolle Stimmung, die Hilfsbereitschaft und die netten Gesprächsrunden bedanken. Ein Dank geht auch an alle übrigen Mitarbeiter.

Mein besonderer Dank gilt meiner Familie, die mich während meines gesamten Studiums immer unterstützt hat, moralisch wie auch finanziell.

Und zuletzt danke ich Andreas ganz herzlich, der mich jederzeit tatkräftig unterstützt, mich immer wieder motiviert und mir mit Geduld bei allen Computerproblemen geholfen hat.