

MOLEKULARBIOLOGISCHE CHARAKTERISIERUNG DER
MASERNVIRUSREPLIKATION IM ZENTRALEN NERVENSYSTEM

VON LEWIS- UND BN-RATTEN

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

vorgelegt von

Sibylle Schneider-Schaulies

aus

Kronach

Würzburg 1988

Eingereicht am: **3. Feb. 1988**

bei der Fakultät für Biologie

1. Gutachter:

2. Gutachter:

der Dissertation

1. Prüfer:

2. Prüfer:

der mündlichen Prüfung

Tag der mündlichen Prüfung: *13. 6. 1988*

Doktorurkunde ausgehändigt am: *18. 7. 1988*

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, daß ich die Dissertation "Molekularbiologische Charakterisierung der Masernvirusreplikation im zentralen Nervensystem von Lewis- und BN-Ratten" 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 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.

Würzburg, den 3.2.88

(Sibylle Schneider-Schaulies)

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

Ich danke Herrn Prof. Dr. V. ter Meulen für die stets freundliche und hilfreiche Anleitung und Betreuung dieser Arbeit und für seine ständige Diskussionsbereitschaft.

Allen Mitarbeitern des Instituts, insbesondere meinen Mitarbeitern im Labor Herrn Dr. K. Baczko, Herrn Dr. U. Liebert und Frau Jeanette Roller, danke ich für ihre Hilfsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

Inhaltsverzeichnis		1
1	Einleitung	5
1. 1.	Akute Masern	5
1. 2.	Zentralnervöse Komplikationen in Folge der akuten Maserninfektion	6
1. 2. 1.	Die akute postinfektiöse Masernenzephalitis	6
1. 2. 2.	Die subakute sklerosierende Panenzephalitis	6
1. 3.	Die Molekularbiologie des Masernvirus	8
1. 3. 1.	Genomische RNA und Transkriptionsstrategie	8
1. 3. 2.	Die Proteine des MV und ihre Funktion im Viruspartikel	13
1. 4.	Molekularbiologische Charakterisierung der Masernvirusreplikation in SSPE-Hirnen	17
1. 5.	Akute und subakute Masernenzephalitis im Tiermodell	18
1. 6.	Fragestellung	24
2.	Material	25
2. 1.	Versuchstiere	25
2. 2.	Gewebekulturzellen	25
2. 3.	Virus	25
2. 4.	Medien, Chemikalien, Enzyme	25
2. 4. 1.	Gewebekultur	25
2. 4. 2.	Bakterien- und Phagenkultur	25
2. 4. 3.	Enzyme	26
2. 4. 4.	Feinchemikalien	26
2. 4. 5.	Chemikalien	26
2. 5.	Radioaktivität	28
2. 6.	Verbrauchsmaterial	28
2. 7.	Geräte	28
2. 8.	Verwendete Plasmid-DNAs	29
2. 8. 1.	M 13- und pSp6-Klone	30
2. 8. 2.	MV-pGem1-Klone	31
3.	Methoden	32
3. 1.	Zucht und Infektion von Gewebekulturzellen	32
3. 2.	Plaquereinigung von Virus	33
3. 3.	Infektion von Versuchstieren	33
3. 4.	RNA-Präparation	34
3. 4. 1.	RNA-Extraktion aus Gewebekulturzellen	34
3. 4. 2.	RNA-Extraktion aus Gewebe	34
3. 4. 3.	Reinigung der RNA über einen CsCl-Gradienten	35

3. 4. 4.	+pA-Selektion von RNA	35
3. 4. 5.	Agarosegele zur Auftrennung von RNA	37
3. 4. 6.	Northern Transfer von RNA	37
3. 5.	Bakterien- und Phagenkultur	38
3. 5. 1.	Bakterienkultur	38
3. 5. 1. 1.	Herstellung kompetenter Bakterien	39
3. 5. 1. 2.	Transformation von Bakterien mit Plasmiden	40
3. 5. 2.	Phagenkultur	40
3. 5. 2. 1.	Transformation von Bakterien mit M13-DNA	40
3. 5. 2. 2.	Präparation von Einzelstrang M13-DNA	41
3. 6.	Plasmidpräparation	41
3. 7.	Reinigung der Plasmid-DNA über einen CsCl-Gradienten	42
3. 8.	Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen	43
3. 9.	Agarosegele zur Auftrennung von DNA	43
3. 10.	Radioaktive Markierung der verwendeten Proben	44
3. 10. 1.	Endmarkierung von ds-DNA mit 5' - überhängenden Enden	44
3. 10. 2.	In vitro Markierung von ds-DNA durch "Nick-Translation"	45
3. 10. 3.	Markierung von ss-DNA durch "Primer-Extension"	46
3. 10. 4.	In vitro Transkription markierter Proben	49
3. 10. 4. 1.	Markierung von RNA-Proben mit ^{32}P -rCTP	50
3. 10. 4. 2.	Markierung der RNA-Proben mit ^{35}S -rUTP	52
3. 11.	Transkription von pGem-MV-DNAs zur Herstellung nichtmarkierter Standard-RNAs	53
3. 11. 1.	Synthese der Standard-RNA-Transkripte	53
3. 11. 2.	Konzentrationsbestimmung der Standard-RNA-Präparate	53
3. 11. 3.	Untermischen der Standard-RNA-Präparationen unter die RNA-Präparationen für die Northern-Blots	54
3. 12.	Northern Blot Hybridisierung	54
3. 13.	Autoradiographie und Szintillationszählung	55
3. 14.	Nuklease S1-Kartierung	56
3. 15.	In situ Hybridisierung	57
3. 15. 1.	Vorbereitung der Objektträger	57
3. 15. 2.	Vorbehandlung und Fixierung der Präparate	59
3. 15. 2. 1.	Gewebekulturzellen	59

3. 15. 2. 2.	Gehirnmaterial	59
3. 15. 2. 2. 1.	Cryostatschnitte	59
3. 15. 2. 2. 2.	Paraffinschnitte	60
3. 15. 3.	Vorbehandlung der Präparate zur Verbesserung der Diffusion der Proben	60
3. 15. 4.	RNA-Hybridisierung	60
3. 15. 5.	Waschen der Hybridisierung	61
3. 15. 6.	Autoradiographie und Röntgenfilmemulsion	62
3. 16.	Methoden zur Darstellung MV-spezifischer Proteinexpression	62
3. 16. 1.	In vivo Markierung MV-spezifischer Proteine	62
3. 16. 2.	In vitro Synthese MV-spezifischer Proteine	63
3. 16. 3.	Immunpräzipitation in vivo oder in vitro synthetisierter MV-spezifischer Proteine	63
3. 16. 4.	Proteingelelektrophorese	64
4.	Ergebnisse	66
4. 1.	Untersuchungen zur Spezifität der verwendeten MV-spezifischen cDNA-Klone und Sensitivität der Hybridisierungsmethoden	66
4. 1. 1.	Hybridisierung der cDNA-Proben mit zellulären Sequenzen	66
4. 1. 2.	Charakterisierung MV-spezifischer Genexpression in lytisch infizierten Gewebekulturen	69
4. 1. 3.	Untersuchungen über die Nachweisgrenzen der verwendeten Hybridisierungsmethoden	71
4. 2.	In vitro Translation der mRNA aus lytisch infizierten Gewebekulturzellen	75
4. 3.	Charakterisierung virusspezifischer Genexpression in MV-infizierten Lewis-Ratten	78
4. 3. 1.	Organspezifität der Expression MV-spezifischer Transkripte	78
4. 3. 2.	Expression MV-spezifischer Tanskripte in Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE und SAME	81
4. 3. 3.	Nachweis einzelner MV-spezifischer Strukturgene in den Gehirnen von Lewis-Ratten	84
4. 3. 3. 1.	Nachweis MV-spezifischer Strukturgene in den Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE	85
4. 3. 3. 2.	Nachweis MV-spezifischer Strukturgene in den Gehirnen von Lewis-Ratten mit SAME	87
4. 3. 3. 3.	Quantitative Analysen der Northern Blots	89
4. 3. 3. 4.	Nachweis MV-spezifischer Transkripte im Gehirn von Tieren mit AE und SAME auf Einzelzellniveau	92

4. 3. 4.	In vitro Translation von +pA-RNAs aus den Gehirnen von akut und subakut erkrankten Lewis-Ratten	97
4. 4..	Nachweis MV-spezifischer Strukturgene in den Gehirnen von BN-Ratten	101
4. 4. 1.	Nachweis MV-spezifischer Strukturgene in BN-Ratten mit AE und CSE	102
4. 4. 1. 1.	Expression des MV-Genoms in BN-Tieren mit AE	102
4. 4. 1. 2.	Expression des MV-Genoms in Tieren mit CSE	104
4. 4. 2.	In vitro Translation der mRNAs aus Gehirnen von BN-Ratten mit AE und CSE	107
4. 5.	Untersuchungen über die pathogenetische Rolle des Immunsystems bei der Etablierung der persistenten Infektion im ZNS	110
4. 5. 1.	Humorale Immunreaktion gegen MV in Serum und Liquor von Lewis-Ratten	111
4. 5. 2.	Charakterisierung der Immunreaktion gegen MV in Serum und Liquor von BN-Ratten	114
4. 5. 3.	"Antikörper-induzierte MV-Persistenz" in neugeborenen Lewis-Ratten	121
4. 5. 4.	In vitro Translation der +pA-RNAs aus den Gehirnen von Antikörper-behandelten Lewis-Ratten	122
5.	Diskussion	125
6.	Zusammenfassung	139
7.	Liste der Abkürzungen	142
8.	Lebenslauf	144
9.	Literaturverzeichnis	145

1. Einleitung

1. 1. Akute Masern

Das Masernvirus (MV) ist ein hochkontagiöser, primaten-pathogener Erreger, der für die bekannte Masernerkrankung verantwortlich ist. Der Kontagiositätsindex liegt bei 95 - 98% und die meisten seropositiven Individuen hatten Kontakt mit dem Virus in früher Kindheit. Die akute Masernerkrankung entwickelt sich auf der Basis einer lytischen Virusinfektion. Nach Exposition mit dem Masernvirus werden Zellen des respiratorischen Epithels und des lymphatischen Gewebes infiziert. In diesen Zielzellen vermehrt sich das Masernvirus lytisch und breitet sich hämatogen im Organismus aus. Zum Zeitpunkt des charakteristischen Masernexanthems findet sich Masernvirus außer in Hautzellen und zirkulierenden peripheren Lymphozyten (Joseph et al., 1975, Fournier et al., 1985, Hyypiä et al., 1985) auch in anderen Organen.

Im allgemeinen wird die Virusausbreitung durch einsetzende immunologische Abwehrreaktion eingedämmt, sodaß die akute Maserninfektion komplikationslos überstanden wird. Ein geringer Prozentsatz der infizierten Patienten entwickelt im Verlaufe der akuten Maserninfektion Komplikationen, die vor allem das zentrale Nervensystem (ZNS) betreffen.

Da eine Infektion des ZNS schwere Krankheitsbilder hervorruft, die entweder zum Tode oder zu Defektheilungen führen, ist die Erforschung der pathogenetischen Mechanismen, die

diesen Komplikationen zugrundeliegen, von großem virologischen Interesse.

1. 2. Zentralnervöse Komplikationen in Folge der akuten Maserninfektion

1. 2. 1. Die akute postinfektiöse Masernenzephalitis

In 0.1% der Fälle mit akuter Maserninfektion entwickelt sich als Komplikation eine klinisch manifeste akute postinfektiöse Masern-Enzephalitis (APME), die 3 - 9 Tage nach Beginn des Exanthems auftritt und in 20 - 40% der Fälle letal verläuft. Gelegentlich kann MV aus Hirngewebe und Liquor der Patienten isoliert werden (ter Meulen et al., 1972), doch handelt es sich aufgrund immunologischer und neuropathologischer Befunde bei dieser ZNS-Erkrankung wahrscheinlich um eine masernvirusinduzierte Autoimmunerkrankung (Gendelman et al., 1984, Johnson et al., 1984) und nicht um einen Entzündungsprozeß in Folge direkter Zerstörung von Hirnzellen durch den infektiösen Erreger.

1. 2. 2. Die subakute sklerosierende Panenzephalitis

Eine zweite, relativ seltene zentralnervöse Komplikation nach der akuten Maserninfektion stellt die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) dar (ter Meulen et al., 1972, ter Meulen und Carter, 1982). Diese zentralnervöse Komplikation wird zu den "Slow-Virus"-Erkrankungen gerechnet und entwickelt sich

auf der Basis einer persistierenden MV-Infektion (ter Meulen et al., 1982, ter Meulen et al., 1983). Nach einem klinisch symptomfreien Intervall von etwa 8 - 10 Jahren nach akuten Masern stellt sich ein chronisch progredienter, entzündlicher degenerativer ZNS-Prozeß ein, der immer tödlich verläuft.

Mit virologischen Untersuchungsmethoden wurden in post mortem entnommenen Hirngewebe bei jedem untersuchten Patienten MV Nukleokapside in zytoplasmatischen und nukleären Einschußkörpern in infizierten Hirnzellen nachgewiesen (Bouteille et al., 1965, Tellez-Nagel et al., 1966). In diesen Einschußkörpern finden sich MV-spezifische Antigene (Conolly et al., 1967, Freeman et al., 1967, Müller und ter Meulen, 1969, Esiri et al., 1982) und virale RNA (Haase et al., 1980, 1981, Shapshak et al., 1986), doch gelingt trotz dieses Nachweises von Masernvirusstrukturen bei SSPE-Patienten die Isolierung von infektiösem Virus aus Hirngewebe nur äußerst selten. Dieser Befund läßt auf einen defekten Replikationszyklus schließen (Horta-Barbosa et al., 1969, ter Meulen et al., 1972, Katz und Koprowski, 1973), was durch die Beobachtung unterstützt wird, daß sich in infiziertem Hirngewebe elektronenoptisch nie komplette Viruspartikel oder Membranveränderungen im Sinne eines "Budding"-Prozesses nachweisen ließen.

Darüberhinaus wurde durch detaillierte immunologische Untersuchungen ein Fehlen der humoralen Immunreaktion gegen das Membran (M)-Protein des MV (Baczko et al., 1984) bei gleichzeitiger Hyperimmunreaktion gegen andere Strukturproteine des Masernvirus festgestellt (Connolly, 1968). Da die SSPE-Virusisolate sich hinsichtlich ihrer RNA (Hall und

ter Meulen, 1976), ihrer Strukturproteine und ihrer Antigenität (Agnarsdottir 1977, Kingsbury et al., 1978, ter Meulen und Carter, 1984) nicht von den Virusisolaten der akuten Masern unterscheiden, wurde die fehlende Immunreaktion gegen das MV M Protein bei SSPE-Patienten als Ausdruck einer nicht stattfindenden Proteinbiosynthese in infizierten Hirnzellen interpretiert (ter Meulen et al., 1983).

Diese virologischen und immunologischen Untersuchungsergebnisse bei SSPE-Patienten lassen erkennen, daß eine weiter Abklärung der Pathogenese dieser Erkrankung nur durch molekularbiologische Untersuchungen möglich ist. So wurden von verschiedenen Gruppen intensive Anstrengungen unternommen, das Masernvirus auf molekularer Ebene zu charakterisieren und Gensonden zu gewinnen, mit denen die Virusinteraktion mit den Zellen des ZNS definiert werden kann.

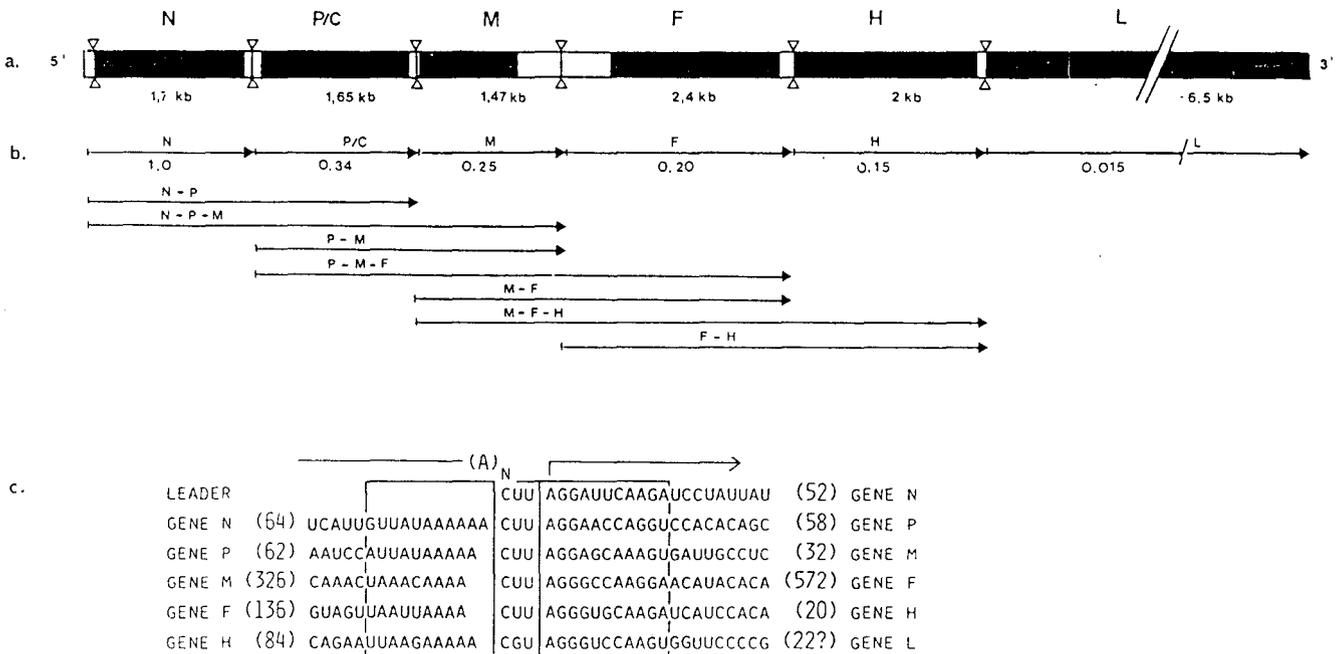
1. 3. Die Molekularbiologie des Masernvirus

1. 3. 1. Genomische RNA und Transkriptionsstrategie

Das Masernvirus gehört zu den Morbilliviren, einer Untergruppe der Paramyxoviren (Fenner, 1976, Kingsbury et al., 1978, Lazzarini et al., 1981, Strauss und Strauss, 1983). Die genomische Nukleinsäure ist ein einzelsträngiges, nichtsegmentiertes RNA-Molekül von etwa 15 kb Länge (Baczko et al., 1983) und negativer Polarität. Es ist nicht infektiös, da es nicht direkt als mRNA benutzt werden kann. Im Viruspartikel verpackt ist eine RNA-abhängige RNA-Polymerase, die in der

Lage ist, sowohl die Transkription der viralen RNA in subgenomische monocistronische mRNAs durchzuführen, als auch, während der Replikation des Genoms, ein replikatives Intermediat der genomischen RNA in voller Länge abzulesen (Lazzarini et al., 1981). Dieses Positiv-Strang-Intermediat, welches komplementär zum Genom ist, ist in Abb. 1a als genomische RNA dargestellt. Nach einer etwa 50 Basen langen "leader"-Sequenz am 5'-Ende folgen in 3'-Richtung die sechs Strukturgene des Masernvirus (MV), die für die folgenden Proteine kodieren: Nukleokapsidprotein (N) - Phosphoprotein (P) - Matrixprotein (M) - Fusionsprotein (F) - Hämagglutininprotein (H) - Large Protein (L) oder Polymerase (Dowling et al., 1986, Rima et al., 1986). Innerhalb des P-Gens existiert ein zweites offenes Leseraster, welches für ein nichtstrukturelles Protein kodiert, das - in Analogie zum Sendai-Virus - als C-Protein bezeichnet wird (Giorgi et al., 1983, Bellini et al., 1985). Eine etwa 800 Basen lange, nichttranslatierte Region erstreckt sich vom 3'-Ende des M-Gens in die 5'-Region des F-Gens hinein (Bellini et al., 1986, Richardson et al., 1986, Wong et al., 1987, Buckland et al., 1987). Mindestens zwei offene Leseraster sind in dieser Sequenz vorhanden, doch wurde bislang in vivo kein entsprechendes Translationsprodukt für eines dieser Leseraster gefunden (Bellini et al., 1986, Greer et al., 1986, Wong et al., 1987).

Abb. 1
 Schema des MV-Genoms in +Strang-Orientierung,
 Transkriptionsstrategie und intergenische Regionen



a. Das ca. 15 kb lange Positiv-Strang-Intermediat des MV-Genoms ist als genomische RNA dargestellt. Die dunkel gezeichneten Bereiche bezeichnen die kodierenden Regionen der einzelnen Strukturgene, deren Längen in kb jeweils unter den entsprechenden Genabschnitten angegeben sind. Die mit offenen Dreiecken bezeichneten Regionen markieren die Position der intergenischen Regionen, deren Sequenzen in Abb. 1c angegeben sind.

b. Die subgenomischen monocistronischen mRNAs sind mit ihren Expressionsraten angegeben. Die Expression der N mRNA ist gleich 1.0 gesetzt, die Expressionsrate der anderen Strukturgene relativ hierzu bestimmt (Cattaneo et al., 1987). Die geschlossenen Dreiecke markieren die Polyadenylierungssequenzen. Unter den monocistronischen Transkripten sind die bi- und tricistronischen Transkriptionsprodukte angegeben. Polycistronische RNAs, die sich über die H-L-intercistronische Region erstrecken, sind bislang nicht nachgewiesen worden.

c. Sequenzen der intergenischen Regionen des MV-Genoms (Billeter et al. 1984, Bellini et al., 1986, Cattaneo et al., 1987) in mRNA-Orientierung dargestellt. Die Entfernungen der kodierenden Regionen von der CUU-Sequenz sind in b in Klammern angegeben.

Zwischen den einzelnen Strukturgenen des MV liegen die konservierten intercistronischen Regionen, die aus einer oligo-U-Sequenz, einem Trinukleotid und einer Initiationssequenz für das folgende Gen bestehen (Abb. 1c) (Bellini et al., 1985, Dowling et al., 1986, Cattaneo et al., 1987).

Die Transkriptionsstrategie des MV ist bisher noch nicht endgültig geklärt. Aufgrund vorhandener Daten und analog zu anderen Paramyxoviren wird angenommen, daß die Polymerase zunächst an der "leader"-Sequenz initiiert und die monocistronische mRNA des N-Gens bis zum Polyadenylierungssignal transkribiert, das den Beginn der intercistronischen Region darstellt. Dort wird durch mehrmaliges Ablezen der oligo-U-Sequenz die entstandene mRNA polyadenyliert und danach an der Initiationssequenz des folgenden P-Gens die nächste mRNA abgelesen (Choppin und Compans, 1975, Strauss und Strauss, 1983, Gupta und Kingsbury, 1985, Banerjee, 1987) (Abb. 1b). Die einzelnen mRNAs werden sequentiell vom 3' zum 5'-Ende des Negativstrang-Genoms mit sinkender Effizienz transkribiert, so daß sich ein Expressionsgradient für die mRNAs der Strukturgene vom N-Gen zum Polymerase-Gen einstellt, wie dies auch für andere nichtsegmentierte Negativstrang-RNA-Viren gezeigt worden ist (Villareal et al., 1976, Iverson und Rose, 1981, Banerjee, 1987). Die relativen Expressionsraten der mRNAs zueinander sind in Abb. 1b angegeben (Cattaneo et al., 1987). Neben den monocistronischen mRNAs sind als subgenomische RNAs noch polycistronische oder sogenannte "readthrough"-Transkripte nachweisbar, die wahrscheinlich dadurch entstehen, daß die

Polymerase die intergenischen Stop- und Reinitiationssignale überliest (Baczko et al., 1984, Barrett und Mahy, 1984, Russell et al., 1985, Rima et al., 1986).

Nach der Primärtranskription der monocistronischen mRNAs und deren Translation in die entsprechenden virusspezifischen Strukturproteine kommt es zur Replikation der genomischen RNA. Der intrazelluläre Spiegel an freiem, nicht assoziiertem N-Protein wirkt vermutlich als Regulationssignal für das Umschalten der viralen Polymerase von der Transkription monocistronischer mRNAs zur Replikation der genomischen RNA: erst wenn genügend N-Protein zur Verpackung der genomischen RNA zur Verfügung steht kommt es zu deren Replikation (Kingsbury et al., 1974, Blumberg et al., 1981, Arnheiter et al., 1985).

Während der Replikation der genomischen RNA entsteht als replikatives Intermediat eine positivsträngige RNA in voller Länge der genomischen RNA. In diesem Falle überliest die Polymerase alle Stop- und Reinitiationssignale der intercistronischen Regionen (Strauss und Strauss, 1983). Der Regulationsmechanismus dieses Funktionswechsels der viralen Polymerase ist bislang noch nicht bekannt. Von dem Positiv-Strang-Intermediat werden wiederum die negativsträngigen genomischen RNAs abgelesen (Choppin und Compans, 1975, Kingsbury et al., 1978, Kolakofsky und Blumberg, 1982, Udem und Cook, 1984). Bis auf das L-Gen ist die Sequenz des MV-Genoms bekannt (Gorecki und Rozenblatt, 1980, Billeter et al., 1984, Rozenblatt et al., 1985, Bellini et al., 1985, 1986, Richardson et al., 1986, Alkhatib und Briedis, 1986, Gerald et al., 1986, Buckland et al., 1987).

1. 3. 2. Die Proteine des MV und ihre Funktion im Viruspartikel

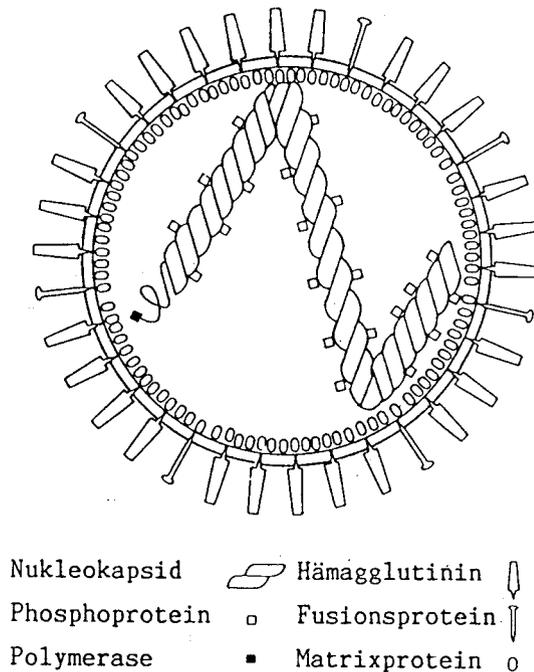
Die monocistronischen mRNAs des MV kodieren für sechs strukturelle und ein nichtstrukturelles Protein (Kingsbury et al., 1978, Rima 1983, Bellini et al., 1985). Im reifen Viruspartikel ist neben den sechs Strukturproteinen (Wechsler und Fields, 1978, Rozenblatt et al., 1979) als zelluläres Protein Aktin enthalten (Wang et al., 1976, Tyrrell und Norrby, 1978, Bohn et al., 1986). Diese Proteine können gelelektrophoretisch in Gegenwart von Detergenz ihrer Größe nach aufgetrennt und ihr Molekulargewicht (MG) bestimmt werden: so weist das Nukleokapsidprotein ein MG von 60 kD, das Phosphoprotein von 70 kD, das Matrixprotein von 37 kD, das Fusionsprotein von 62 kD, das Hämagglutininprotein von 80 kD und das Large Protein oder Polymeraseprotein ein MG von 180-200 kD auf (Graves et al., 1978, Vanionpää et al., 1979, Rima, 1983). Das nichtstrukturelle, in einem zweiten Leseraster des P-Gens kodierte C-Protein mit einem Molekulargewicht von 20 kD wurde im Zellkern und in zytoplasmatischen Einschlüssen infizierter Zellen gefunden (Bellini et al., 1985). Die Lokalisation der viralen Strukturproteine im Viruspartikel ist in Abb. 2 dargestellt.

Das Viruspartikel besteht aus zwei funktionell unterschiedlichen strukturellen Untereinheiten: einem im Inneren des Partikels lokalisierten Ribonukleoproteinkomplex (RNP-Partikel) und einer Lipidhülle, die beide untereinander durch das M-Protein verbunden sind (Stallcup et al., 1983).

Das RNP-Partikel setzt sich aus der viralen genomischen RNA und drei Strukturproteinen (N, P und L) zusammen (Rozenblatt et al., 1979a). Das N-Protein ist das häufigste virale Strukturprotein. Es ist phosphoryliert (Fujinami und Oldstone 1979, Rima 1983) und ermöglicht die Kondensierung der viralen genomischen RNA in einen Protein-RNA-Komplex, der die virale Nukleinsäure vor dem Abbau durch zelluläre Nukleasen schützt. Die beiden anderen Proteine des RNP-Partikels, das L-Protein und das Phosphoprotein, bilden zusammen den Polymerasekomplex (Stallcup et al., 1979, Banerjee, 1987). Das RNP-Partikel, das auch den replikativen Komplex darstellt, ist infektiös, da es zur Replikation der viralen RNA und zur Transkription der subgenomischen mRNAs in der Zelle in der Lage ist (Rozenblatt et al., 1979b). Veränderungen in einem dieser drei Strukturproteine, die dessen Funktionsfähigkeit beeinträchtigen, führen zu einem abortiven Infektionsverlauf (Rozenblatt et al., 1979b).

Die zweite strukturelle Untereinheit des MV ist die Lipidhülle, in die die beiden viralen Glykoproteine (gp) F und H eingelagert sind. Sie sind als "spike"-ähnliche Projektionen elektronenmikroskopisch an der Oberfläche infizierter Zellen und von Viruspartikeln erkennbar. Die Virushülle spielt eine wesentliche Rolle für die Adsorption an die Zielzelle und die Penetration des Virus durch die Zellmembran. Das 80 kD Hämagglutinin ist für die Anheftung an den Rezeptor auf der Zelloberfläche verantwortlich (Walsh et al., 1984). Nach der Bindung an den Virusrezeptor der Zelle ermöglicht das Fusionsprotein eine Verschmelzung der Virushülle mit der Zell-

Abb. 2.
Schematische Darstellung des MV und seiner Strukturproteine



Das pleomorphe MV-Partikel ist hier kugelförmig, die MV-Strukturproteine sind schematisch in ihrer Lokalisation im Viruspartikel dargestellt. (Abb. nach Carter und ter Meulen, 1987)

membran (Merz et al., 1980) und damit die Einschleusung des RNP-Komplexes in das Zytoplasma der Zelle.

Das F-Protein wird, wie alle bisher charakterisierten fusionsaktiven Proteine der Paramyxoviren, als Vorläuferprotein F₀ (62 kD) synthetisiert und dann durch Wirtszellproteasen in seine biologisch aktive Form überführt (Kingsbury et al., 1978). Dabei entstehen das nicht-glykosylierte F₁-Protein (40 kD) und das glykosylierte F₂-Protein (22 kD). Die beiden Spaltprodukte bleiben über Disulfidbrücken untereinander verbunden (Scheid und Choppin, 1977, Mountcastle

und Choppin, 1977). An der amino-terminalen Region des F₁-Proteins wird durch die proteolytische Spaltung eine hydrophobe Aminosäuresequenz mit membranfusionierenden Eigenschaften freigelegt (Paterson und Lamb, 1987), der wahrscheinlich eine wesentliche Rolle beim Fusionsprozeß zukommt (Richardson et al., 1980, Varsanyi et al., 1985). Die beiden Glykoproteine des MV stellen aufgrund ihrer Lage auf der Oberfläche der infizierten Zellen und ihrer Bedeutung für den Infektionsverlauf die hauptantigenen Strukturen des Virus dar, gegen die neutralisierende Antikörper gerichtet sind (Giraudon und Wilde, 1985).

Das Matrixprotein ist als Bindeglied zwischen den beiden strukturellen Untereinheiten des MV-Partikels an der Innenseite der Lipidhülle angelagert (Stallcup et al., 1979). Es interagiert sowohl mit dem RNP-Komplex als auch mit der Lipidhülle, ohne selbst integraler Bestandteil einer dieser beiden Komponenten zu sein. Das M-Protein spielt eine wesentliche Rolle für den "Budding"-Prozeß des Virus aus der Zelle (Yoshida et al., 1976): Virus-"Budding" wird erst durch die Verbindung der RNP-Partikels mit den Regionen der Zellmembran möglich, in die virale Glykoproteine eingelagert sind (Choppin und Compans, 1975, Kingsbury et al., 1985). Zelluläres Aktin, das wahrscheinlich über eine Interaktion mit dem M-Protein an dem viralen "Budding"-Prozeß beteiligt ist (Giuffre et al., 1982, Stallcup et al., 1983, Bohn et al., 1986), wird dabei ebenfalls in das reife Viruspartikel verpackt.

1. 4. Molekularbiologische Charakterisierung der Masernvirusreplikation in SSPE-Hirnen

Aufgrund der Erkenntnisse über die Molekularbiologie des Masernvirus gelang in den letzten Jahren eine biochemische Charakterisierung der Genexpression des MV in SSPE-Gehirnen (Baczko et al., 1984, 1986, Haase et al., 1985). Es ergab sich hierbei, daß in allen untersuchten SSPE-Patienten die virale Genexpression selektiv restringiert ist. Auf jeweils unterschiedlichen Ebenen ist die virale Transkription in subgenomische mRNAs und deren Translation in die viralen Strukturproteine inhibiert. Die Restriktion der Genexpression kann vor allem für die beiden Hüllproteine F und H und für das M-Protein gezeigt werden (Baczko et al., 1986, Liebert et al., 1986, Cattaneo et al., 1987). Defekte in der Expression dieser Genprodukte führen dazu, daß der virale Reifungsprozeß verhindert und komplettes, infektiöses Virus nicht aus den infizierten Zellen freigesetzt werden kann. Diese Befunde erklären die beobachteten immunologischen Veränderungen.

Da die Untersuchungen an SSPE-Gehirnen den Endzustand einer persistierenden Infektion reflektieren, sagen sie wenig über die Mechanismen aus, die zur Etablierung und zum Erhalt der Viruspersistenz in einem immunologisch kompetenten Organismus führen. Zur Beantwortung dieser Fragestellungen sind Tierversuche erforderlich, da nur sie einen experimentellen Zugang gestatten.

1. 5. Akute und subakute Masernenzephalitis im Tiermodell

Mehrere Tiermodelle für MV-induzierte ZNS-Infektionen sind etabliert und publiziert worden (Morgan und Rapp 1977, Rammohan et al., 1983), doch eigneten sie sich nicht zur Analyse der bei der SSPE anstehenden virologischen Fragestellungen. Deshalb wurde im Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg in den letzten Jahren ein Modellsystem für eine SSPE-ähnliche Erkrankung in immungenetisch unterschiedlichen Inzuchtrattenstämmen entwickelt (Liebert und ter Meulen, 1987, Liebert et al., 1988).

Hierfür wurde das Masernvirus CAM/RBH auf Lewis- und Brown Norway (BN)-Ratten adaptiert. Nach intrazerebraler Inokulation dieses Virus entwickelt sich ein zentralnervöser Krankheitsprozeß, der Ähnlichkeiten mit der SSPE aufweist.

Der Verlauf der Erkrankungen in den Ratten ist unterschiedlich in Abhängigkeit vom Alter (Tab. 1). Neugeborene Ratten beider Stämme sterben wenige Tage nach der Inokulation mit dem Virus an einer akuten Enzephalitis (AE). Die Inzidenz der Erkrankung und deren Mortalitätsrate betragen 100%. Vier Wochen alte oder ältere Lewis-Ratten entwickeln nach Infektion mit dem Virus entweder mit einer Inzidenz von etwa 80% eine AE oder, in etwa 20% der Fälle, eine subakute Masernenzephalitis (SAME), die nach einer Inkubationszeit von vier Wochen bis zu drei Monaten manifest wird. Histopathologisch ist die SAME im Gegensatz zur AE durch prominente lymphomonozytäre Infiltrate bei nur geringer Parenchymschädigung ohne Demyelinisierung

charakterisiert (Liebert und ter Meulen, in Vorbereitung).

BN-Ratten derselben Altersgruppe (vier Wochen und älter) entwickeln die AE mit wesentlich geringerer Inzidenz (17%). BN-Tiere, die nach Exposition mit dem Virus nicht an einer AE erkranken, bleiben weiterhin symptomfrei. Histologisch jedoch zeigen etwa 30% dieser klinisch gesunden Tiere 30 Tage nach der Infektion eine Enzephalitis, die als klinisch stumme Enzephalitis (CSE) bezeichnet wird.

Infektiöses MV kann aus Gehirnen von akut erkrankten Tieren beider Stämme entweder direkt aus Gewebehomogenat oder durch Kokultivation mit permissiven Zellen reisoliert werden. Aus den Gehirnen von subakut erkrankten Lewis-Ratten gelingt die Virusisolation nur in sehr seltenen Fällen. Bei BN-Tieren mit CSE sind bislang alle Versuche zur Reisolierung infektiöser Viruspartikel negativ verlaufen.

Der Nachweis MV-spezifischer Proteine in Gehirnen von Tieren, die entweder eine akute, eine subakute oder eine klinisch stumme Enzephalitis entwickeln, erfolgte mit immunhistologischen Techniken (Tab. 2). Während N- und P-Protein in allen Typen der ZNS-Infektion nahezu in gleicher Anzahl von infizierten Zellen exprimiert werden, ist die Expression des M-Proteins und der beiden viralen Glykoproteine F und H bereits in der AE auf einen geringen Prozentsatz der infizierten Zellen beschränkt. Dieses Phänomen ist für die SAME und die CSE noch wesentlich ausgeprägter.

Tab. 1.

Zusammenfassung der unterschiedlichen Krankheitsverläufe in Lewis- und BN-Ratten nach intrazerebraler Inokulation mit MV-CAM/RBH

Stamm	Erkrankung	Alter*	Inkubation&	Inzidenz+	Mortalität\$	
Lewis	AE	2	5 + 1	17/17	100 %	
		5	6 + 1	21/21	100 %	
		14	9 + 4	19/19	100 %	
		28	13 + 4	19/25	68 %	
		50	12 + 4	28/38	60 %	
	SAME	2 - 14	-			
		28	36 + 13	4/25	8 %	
		50	50 + 21	7/38	11 %	
	BN	AE	1 - 4	8 + 2	18/18	100 %
			20 - 35	12 + 3	6/36	8 %§
CSE		20 - 35	(30 - 60)	0/26	- #	

* Alter (in Tagen) zum Zeitpunkt der Inokulation mit CAM/RBH-Virus

& Inkubationszeit in Tagen

+ Anzahl der erkrankten/Anzahl der inokulierten Tiere

\$ Anzahl der verstorbenen/Anzahl der inokulierten Tiere in Prozent

§ 50 % der getöteten Tiere zeigten histologisch leichte Enzephalitiden

31 % der klinisch gesunden Tiere hatten stumme Enzephalitiden

AE = Akute Enzephalitis

SAME = Subakute Masernenzephalitis

CSE = Klinisch stumme Enzephalitis

Tab. 2
Expression der MV-Strukturproteine in den Gehirnen von infizierten Lewis- und BN-Ratten

Rattenstamm	Erkrankungsbild	N	Strukturprotein			
			P	M	F	H
Lewis	AE (n = 6) dpi 6 - 14	100	96,1	7,6	12,1	30,0
	SAME (n = 14) dpi 27 - 58	100	91,6	0,2	0,8	2,3
BN	AE (n = 6) dpi 5 - 14	100	93,9	10,6	20,9	11,7
	CSE (n = 6) dpi ca. 30	100	95,1	5,2	10,4	11,7

Expression der MV-Strukturproteine, die durch Immunfluoreszenz mit markierten Antikörpern verschiedener Spezifität bestimmt wurde. Die Gehirne wurden jeweils mit Antikörpern gegen das N-Protein und je ein weiteres Strukturprotein gleichzeitig gefärbt. Die Anzahl der N-Protein exprimierenden Zellen wurde gleich 100% gesetzt und die Expression des zweiten Strukturproteins relativ dazu berechnet. Die Angaben erfolgen jeweils in Prozentzahlen.

Die Restriktion der Genexpression MV-spezifischer Strukturproteine in den infizierten Gehirnzellen läßt auf einen defekten Replikationszyklus des MV schließen, wie er ähnlich für die SSPE beschrieben wurde (Baczko et al., 1986, Liebert et al., 1986).

Die Entwicklung der unterschiedlichen Krankheitsbilder auf der Basis persistierender Infektionen, die in den beiden immungenetisch unterschiedlichen Inzuchtstämmen auftreten, legen eine mögliche Immunpathogenese bei der Etablierung der persistenten zentralnervösen Infektion nahe.

So weisen BN-Ratten eine starke humorale Immunreaktion gegen MV auf, während Lewis-Ratten nach MV-Infektion wesentlich niedrigere antivirale Antikörpertiter entwickeln (Tab. 3, Dörries et al., zur Veröffentlichung eingereicht).

Wie Versuche mit Hamstern (Wear und Rapp 1971) und Rhesusaffen erkennen lassen (Albrecht et al., 1972), kann die Inzidenz und der Ausprägungsgrad von durch MV induzierten Enzephalitiden durch die Gegenwart von hohen antiviralen Antikörpertitern reduziert werden. Durch Versuche in Gewebekultur mit neuronalen Zell-Linien konnte gezeigt werden, daß vor allem neutralisierende anti-H-Antikörper in der Lage sind, die Expression von intrazellulärem MV auf transkriptioneller und translationeller Ebene zu restringieren (Fujinami et al., 1979, 1980, 1984, Carter et al., 1984, Barrett et al., 1985). Dieses Phänomen wurde als antikörperinduzierte antigene Modulation (AIAM) bezeichnet.

Da die beiden Inzuchtrattenstämme immunologisch unterschiedlich auf das Masernvirus reagieren, erlaubt dieses Tiermodell, den Einfluß virusspezifischer Antikörper auf den Verlauf und die Ausprägung der zentralnervösen Infektion molekularbiologisch zu untersuchen.

Tab. 3

Humorale antivirale Immunreaktion in Serum von Lewis- und BN-Ratten nach intrazerebraler Inokulation mit neurotropem MV-CAM/RBH

	Lewis AE	Lewis SAME	BN AE	BN CSE
Elisa	< 1 : 40	1 : 80	< 1 : 40	1 : 640
HHT	n. n.	< 1 : 8	n. n.	1 : 32
NT	n. n.	1 : 20	n. n.	1 : 320

n. n. = nicht nachweisbar (untere Titerstufe für Elisa 1 : 40, für HHT 1 : 8, für NT 1 : 10)

Elisa = Enzymgekoppelter Immunoabsorbent-Test zum Nachweis bindender Antikörper (Liebert et al., 1988)

HHT = Hämagglutinationshemmtest

NT = Neutralisationstest zum Nachweis virusneutralisierender Antikörper

Angegeben sind die Mittelwerte von folgenden Bestimmungen: AE Lewis: 34 Seren, AE BN: 29 Seren, SAME Lewis: 68 Seren, CSE BN: 24 Seren

1. 6. Fragestellung

Die virologischen und immunhistologischen Ergebnisse in dem Masernvirus-Ratten-Modell weisen auf einen defekten Replikationszyklus des MV in den Gehirnen beider Inzuchtstämme bereits kurze Zeit nach Virusinokulation hin. Aufgabe der vorliegenden Arbeit war es, die dieser Restriktion zugrundeliegenden Phänomene auf molekularer Ebene zu charakterisieren. Hierbei sollte analysiert werden, ob die fehlende Expression der viralen Strukturproteine M, F und H aufgrund eines Blocks in der Synthese der entsprechenden mRNAs oder aufgrund posttranskriptioneller Defekte zustande kommt. Weiter sollten auf molekularer Ebene mögliche Unterschiede der Genexpression in der akuten und subakuten Form der Erkrankung in beiden Rattenstämmen untersucht werden. Der unterschiedliche immunologische Hintergrund der beiden Inzuchtstämme bot zudem die Möglichkeit, Unterschiede in der Genexpression des MV abhängig vom humoralen Immunstatus zu untersuchen und mögliche Einflüsse antiviraler Antikörper auf die Replikation des Virus im Gehirn der infizierten Tiere zu charakterisieren.

2. Material

2. 1. Versuchstiere

Inzuchtratten der Stämme Lewis und Brown Norway (BN) wurden vom Zentralinstitut für Versuchstiere in Hannover bezogen. Die Tiere weisen keine Antikörper gegen Masernvirus auf.

2. 2. Gewebekulturzellen

Für die Gewebekultur wurden Verozellen (African green monkey kidney cells) verwendet.

2. 3. Virus

Für die Infektion von Gewebekulturzellen wurde der Edmonston-Stamm des Masernvirus, für die Infektion der Ratten das CAM (Chorio-Allantois-Membran)R/40-Masernvirus (Labor Dr. Yamanouchi, Tokyo) verwendet (Liebert und ter Meulen, 1987).

2. 4. Medien, Chemikalien und Enzyme

2. 4. 1. Gewebekultur

Aminosäuregemisch	Gibco
Antibiotika	Apotheke
FKS (Fötale Kälberserum)	Gibco
Glutamin	Roth
β-Merkaptoethanol	Sigma
MEM (Minimal essential medium)	Hausmedium

2. 4. 2. Bakterien- und Phagenkultur

Bakterienstämme JM 83, JM 103, HB 101

Agar	Difco
Ampicillin	Apotheke
Bacto-Tryptone	Difco
Bacto Hefe Extrakt	Difco
Lysozym	Sigma
Tetracyclin	Sigma

2. 4. 3. Enzyme

DNA-Polymerase I	Boehringer
DNase I	Boehringer
DNase I (RQ)	Promega
Klenow-Polymerase	Pharmacia
Proteinase K	Boehringer
Restriktionsendonukleasen	Boehringer
RNase A	Boehringer
RNasin	Promega
S1-Nuklease	Pharmacia
Sp6-RNA-Polymerase	Boehringer
T7-RNA-Polymerase	Boehringer

2. 4. 4. Feinchemikalien

Amplify	Amersham
Aprotinin	Sigma
BSA (Rinderserumalbumin)	Sigma
DTT (Dithiothreitol)	Boehringer
Lachs-DNA	Sigma
Lambda-DNA	Amersham
Nukleotide (rNTP, dNTP)	Boehringer
N 90-Retikulozyten-Lysat	Amersham
oligo-dT-Zellulose	Sigma
PMSF (Phenylmethylsulfonylfluorid)	Serva
Protein-A-Sepharose	Pharmacia
Spermidin	Sigma
Thiamin-HCl	Sigma
tRNA (aus Hefe)	Sigma

2. 4. 5. Chemikalien

Acrylamid	Biorad
Agarose	BRL
Ammoniumazetat	Merck
Ammoniumchlorid	Merck
Ammoniumperoxodisulfat	Biorad
Antifoam Emulsion	Sigma
Azeton	Roth
N -N-Methylen-Bisacrylamid	Biorad
Borsäure	Merck
Bromphenolblau	Merck
Butanol	Roth
Caesiumchlorid	BRL

Chloroform	Roth
Diethylpyrocarbonat	Sigma
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
DOC (Natriumdesoxychololat)	Merck
EDTA (Dinatriummethylen-diaminotetraacetat)	Roth
Essigsäure	Roth
Essigsäureanhydrid	Sigma
Ethanol	Roth
Ethidiumbromid	Sigma
Ficoll	Pharmacia
Fixogum	Marabu
Formaldehyd	Merck
Formamid	Merck
Gamma-aminopropyl-triethoxy-Silan	Fluka
Glucose	Roth
Glyzerin	Merck
Glycin	Merck
Guanidiniumrhodanid	Fluka
Harnstoff	Merck
Hepes (N(2-Hydroxyethyl)-piperazin-N-2-ethan-sulfonsäure)	Serva
Isopentan	Roth
Isopropanol	Roth
Kaliumazetat	Merck
Kaliumchlorid	Merck
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck
Di-Kaliumhydrogenphosphat	Merck
Kaliumhydroxid	Merck
Kalziumchlorid	Merck
Magnesiumchlorid	Merck
Magnesiumsulfat	Merck
Methanol	Roth
Morpholinsulfonsäure	Sigma
Natriumazetat	Merck
Natriumcitrat	Roth
Natriumchlorid	Roth
Natriumdihydrogenphosphat	Merck
Di-Natriumhydrogenphosphat	Roth
Natriumhydroxid	Merck
Natronlauge	Merck
Natrium-meta-periodat	Merck
Nonidet P 40	Roth
Paraformaldehyd	Merck
Phenol	Fluka
Polyethylenglykol (PEG)	Serva
Polyvinylpyrrolidin	Merck

Saccharose	Merck
Salzsäure	Roth
Sarkosyl	Sigma
SDS (Natriumdodecylsulfat)	Merck
Sephadex G-50	Pharmacia
TEMED (N,N,N,N,-Tetramethyl-Ethylendiamin)	Biorad
Triethanolamin	Sigma
Trichloressigsäure	Roth
Tris (Tris-(hydromethyl-)aminomethan)	Sigma
Triton X 100	Sigma
Xylen-Cyanol	Serva
Zinkchlorid	Merck
Zinksulfat	Merck

2. 5. Radioaktivität

^{32}P -rCTP (3000 Ci/mmol)	Amersham
^{35}S -rUTP (400 Ci/mmol)	Amersham
^{35}S -Methionin	Amersham
^{35}S -dATP (3000 Ci/mmol)	Amersham
^{14}C -Protein-Marker	Amersham

2. 6. Verbrauchsmaterial

Abstandhalter (PAGE)	Gibco-BRL
Filmkassetten	Suprema
Glasfaserfilter	Whatman
Glaswatte	Serva
Nitrozellulosefolie	Schleicher
3MM-Papier	Whatman
Pipetten	Eppendorf
Platinöse	Hartenstein
Quarzküvetten	Hartenstein
Röntgenfilme Cronex 2	Du Pont
Röntgenfilmemulsion NTB 2	Kodak

2. 7. Geräte

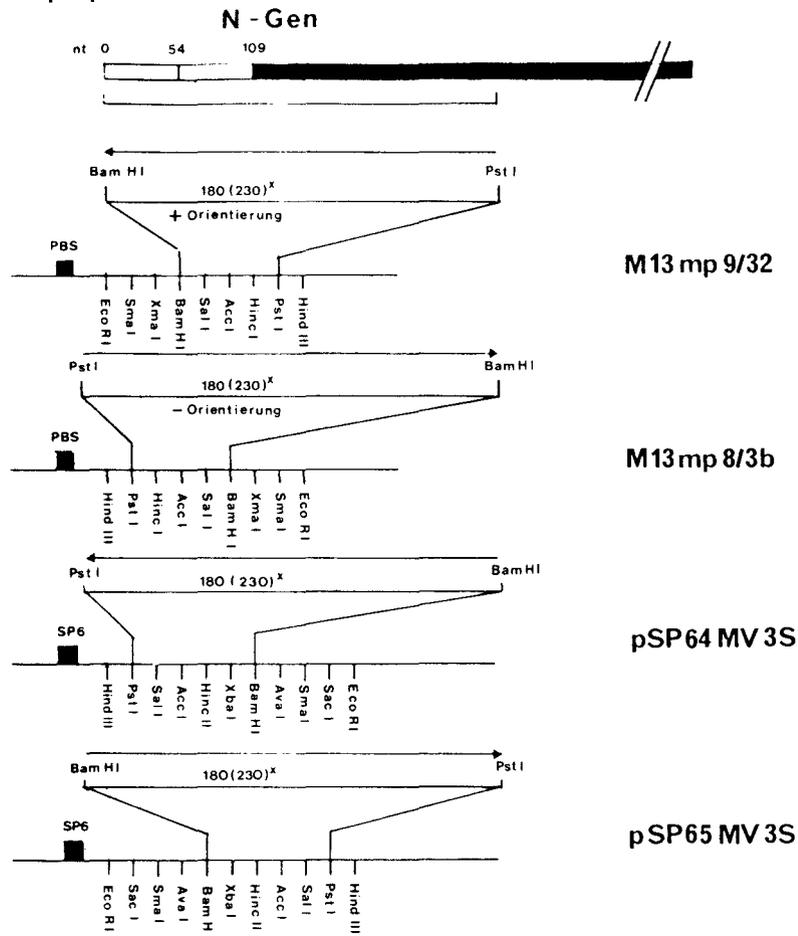
Autoklav	Stiefenhofer
Bakterienschüttler	N. Brunswick
Bakterienbrutschrank	Ehret
Eismaschine	Sunbeam Mile
Folienschweißgerät Polystar	Risch&Herfurt
Gefriermikrotom	Leitz

Gelkammern	Werkstatt
Geltrockner	Biorad
Inkubationsschrank für Zellen	Biorad
Laminar-Flow-Bank	Heräus
Magnetrührer	Ika Combimag
pH-Meter	Ingold K455
Pipettierhilfe	Tecnomara
Rotoren: GS 3, GS A, SS 34, SW 28, SW 41, ViTi 65	Sorvall, Beckmann
Sofortbildkamera MP 4-Land	Polaroid
Schüttelwasserbäder	Gerhardt
Spannungsgeräte	Biorad, Hölzl
Spektralphotometer	Zeiss
Szintillationszähler	Beckmann
Tischzentrifugen	Eppendorf, Hettich
Trockner für Objektträger	Oncor
Ultraschallgerät Sonifier	Bronson, Danbury
UV-Transilluminator	UVP Inc.
Vakuuofen	Ehret
Waage 300 MC	Precisa
Zentrifugen: RC-5 Superspeed	Sorvall
Ultra L8 70	Beckmann
Zytozentrifuge	Shandon Elliot

2. 8. Verwendete Plasmid-DNAs

Alle verwendeten Klone wurden in einer kollaborativen Zusammenarbeit zwischen dem Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität Würzburg und dem Labor von Herrn Professor Billeter im Institut für Molekularbiologie II der Universität Zürich hergestellt und uns für die Untersuchungen in dieser Arbeit zur Verfügung gestellt.

2. 8. 1. M13- und pSp6-Klone



Das 180 bp lange Bam HI/Pst I-Fragment der ursprünglich in pBr322 klonierten MV-N-Gen-spezifischen cDNA (Billeter et al., 1984) ist, nach Ligation an GC-Linker in die Polylinker-Region der pSP64- bzw. pSP65-Vektoren und des Bakteriophagen M13 mp8 bzw. mp9 kloniert worden. Die Abbildung zeigt die erhaltenen rekombinanten Phagen- bzw. Plasmid-DNAs. Die Länge des Fragments (180 bp) bzw. des Fragments einschließlich der Linkersequenzen (230 bp) ist angegeben, ebenso die Orientierung der klonierten cDNA in mRNA-Richtung. Die als "PBS" bezeichneten Regionen auf der Bakteriophagen-DNA markieren schematisch die Bindungsstellen für den 15 b langen Sequenzierprimer, die mit "SP6" bezeichneten Regionen auf den pSP6-DNA die Lage des Promotors für die SP6-Polymerase.

Die Position des cDNA-Klons innerhalb des N-Genes ist über den rekombinanten DNAs schematisch dargestellt. NT (Nukleotid) 0 bezieht sich auf den Beginn des MV-Genoms, nt 54 bezeichnet die Position der dem N-Gen vorgeschalteten intergenischen Region (siehe Abb. 1), nt 109 den Beginn der kodierenden Region des N-Genes.

2. 8. 2. MV-Gemini1-Klone

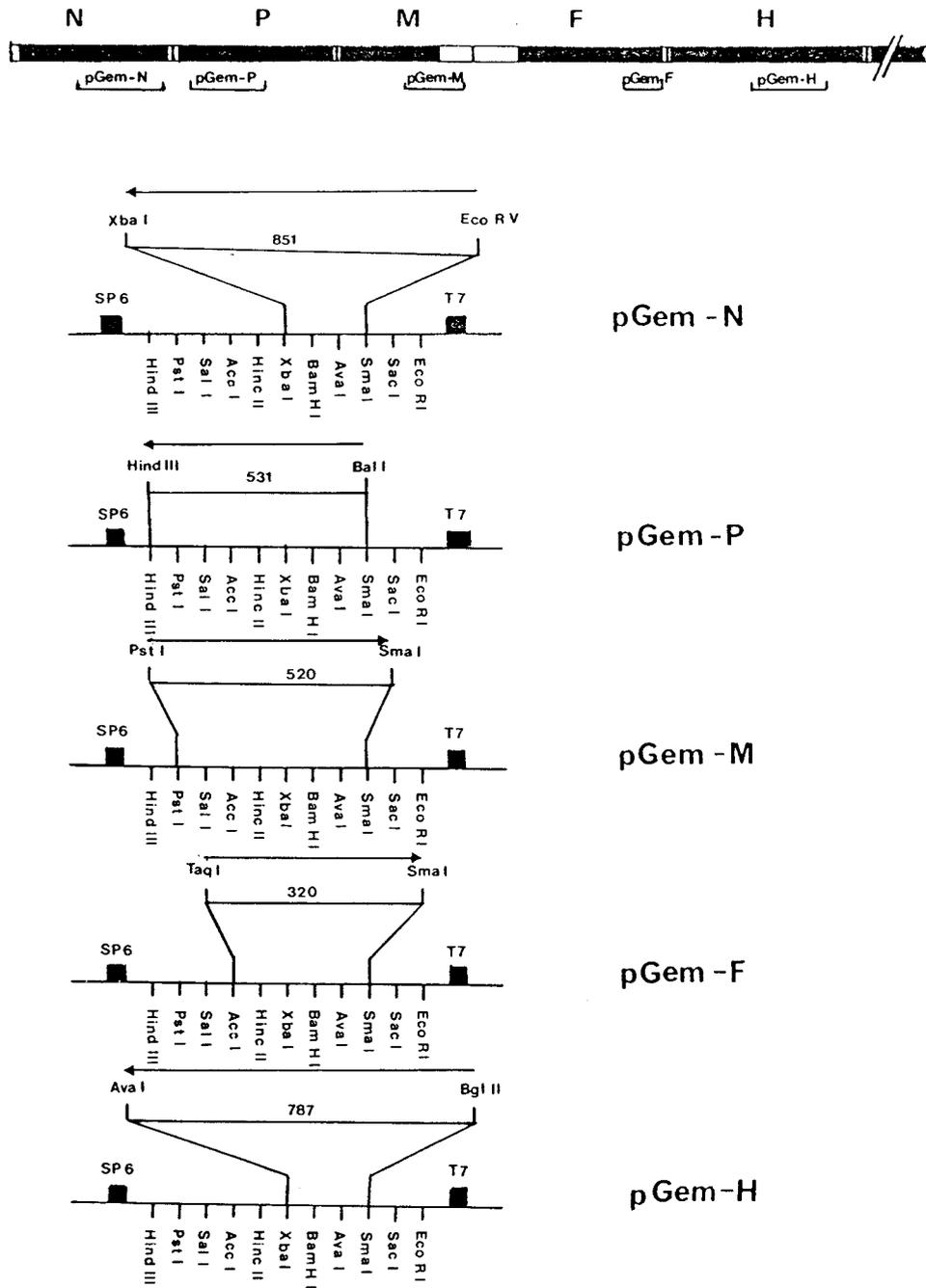


Abb. 4 MV-pGem1-Plasmide

Abb. 4 MV pGem1-Plasmide

In der Abbildung sind die für die Hybridisierungsexperimente verwendeten MV-pGem1-Plasmid-DNAs in ihrer Länge, Orientierung und Position innerhalb des MV-Genoms dargestellt. Sämtliche pGem-1-Klone wurden von Herrn Prof. Dr. Billeter aus Zürich zur Verfügung gestellt. Die MV-spezifischen Fragmente, deren Länge in bp jeweils angegeben ist, sind in die Polylinker-Region des pGem1-Vektors kloniert, die von Promotoren für die beiden Bakteriophagen-Polymerasen SP6 und T7 flankiert werden (die Positionen der Promotoren sind als schwarze Blöcke unter der Bezeichnung SP6 und T7 auf der Vektor-DNA angegeben). Die Pfeile oberhalb der klonierten MV-Fragmente geben die Orientierung der cDNAs jeweils in mRNA-Richtung an. Die Position der einzelnen pGem1-Klone innerhalb der jeweiligen Strukturgene ist oberhalb der Klone in der schematischen Darstellung des MV-Genoms angegeben (zur Darstellung des MV-Genoms siehe auch Abb. 1). Zur Linearisierung der Plasmid-DNAs vor der in vitro Transkription kann jeweils Eco RI bzw. Hind III, die im Polylinker gelegen sind, verwendet werden.

3. Methoden

3. 1. Zucht und Infektion von Gewebekulturzellen

Verozellen werden in serumhaltigem MEM-Medium (5% inaktiviertes fötales Kälberserum (FKS), 1 x nichtessentielle Aminosäuren, 100 ug/ml Streptomycin, 100 U/ml Penicillin, 0.05% Glutamin) mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen/ml in 500 ml-Plastikflaschen ausgesät und im Brutraum bei 37° inkubiert. Die Zellen werden nun so lange unter diesen Bedingungen gezüchtet (gegebenenfalls verbunden mit dem Wechsel des Kulturmediums nach zwei Tagen), bis sie als dichter Zellrasen einen sogenannten "monolayer" bilden.

Für die Infektion werden diese fast konfluenten Zellen mit dem entsprechenden Virus (CAM/RBH oder Edmonston-Virus) mit einer MOI von 0.1 infiziert. Das Virus wird in 10 ml Medium für 2 Stunden bei 37° unter ständiger Bewegung auf der Rockerplattform adsorbiert. Anschließend wird das Medium gewechselt. Die Zellen werden weiterhin bei 37° im Brutraum

gezüchtet, bis sich der für das Masernvirus typische zytopathische Effekt (CPE) zeigt. Dieser ist nach etwa 24 Stunden durch die Ausprägung von Synzytien zu beobachten. Die Zellen werden sowohl für die Herstellung von markierten Zell-Lysaten als auch für die RNA-Extraktion erst dann geerntet, wenn der CPE ein Maximum erreicht hat und der gesamte Zellrasen fast ein einziges Synzytium bildet.

3. 2. Plaquereinigung von Virus

Verozellen werden in mit einer Dichte von 1×10^6 Zellen in 6-Näpfen-Platten ausgesät und bei Semikonfluenz mit 1 ml Stockvirus-Suspension (aus dem Überstand einer infizierten Gewebekulturflasche) für 1 Stunde bei 37° infiziert. Nach der Adsorption wird die Virussuspension sauber abgezogen. Die Zellen werden vorsichtig mit 45° warmem MEM/Agar-Gemisch (2 x MEM + 0.5% Agar) überschichtet. Nach Aushärtung des Topagars werden die Zellen für 4 Tage im Brutschrank unter CO_2 -Begasung inkubiert.

Die Zellen werden anschließend mit Neutralrot gefärbt und Plaques durch Ausstechen mit sterilen Pasteurpipetten entnommen. Einzelne Plaques werden in 5 ml MEM-Medium mit 5% FKS gegeben und jeweils in 10er-Schritten verdünnt. Die so erhaltenen Virus-Verdünnungen werden wiederum auf semikonfluente Verozellen adsorbiert, mit Topagar überschichtet und für 4 Tage im Brutschrank inkubiert. Die Plaquereinigung wird für die Herstellung eines sogenannten "Master-Stocks" noch zweimal wiederholt. Nach der letzten Plaquereinigung wird der Titer des Virus bestimmt. Mit diesem "Master-Stock" werden Zellen infiziert. Bei maximalem CPE wird das Medium bis auf 10 ml Überstand entfernt. Dieser wird in 1 ml-Portionen bei -110° eingefroren und als "Submaster" bezeichnet. Nach einer weiteren Passage dieses Virus werden die nun erhaltenen Überstände als "working stocks" bezeichnet und im weiteren für die Infektion von Gewebekulturzellen für die Präparation von RNA oder markiertem Zell-Lysat verwendet

3. 3. Infektion von Versuchstieren

Der an Rattenhirn adaptierte CAM R/40 Stamm des Masernvirus (aus dem Labor von Dr. K. Yamanouchi, Measles Virus Institut, Tokyo, Japan) wurde zweimal über Verozellen und viermal über das Gehirn von neugeborenen Lewis-Ratten passagiert. Ein

25%iges Rattenhirnhomogenat (CAM/RBH, 4×10^5 TCID₅₀ /ml) aus klinisch schwer erkrankten Ratten oder der Überstand aus lytisch infizierten Verozellen (CAM/Vero, 8×10^6 p.f.U/ml) dienten als Ausgangsvirus. Den Versuchstieren werden in die linke zerebrale Hemisphäre mit einer Spritze 25 µl des CAM/RBH injiziert. Kontrolltiere werden entweder scheininfiziert oder mit Hirnhomogenat von gesunden Lewis-Ratten inokuliert.

3. 4. RNA-Präparation

3. 4. 1. RNA-Extraktion aus Gewebekulturzellen

Die infizierten oder nicht infizierten "monolayer"-Zellen werden nach Entfernung des Kulturmediums einmal mit PBS (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 1,4 mM NaHPO₄, 1,5 mM KH₂ PO₄, 0,9 mM CaCl₂, 0,5 mM MgCl₂) gewaschen und anschließend durch die Zugabe von 10 ml kaltem Thiocyanatpuffer (4 M Guanidiniumrhodanid, 0,5% SDS, 25 mM Natriumcitrat pH 7,0, 0,1 M β-Merkaptoethanol, 0,1% Antifoam-Emulsion) lysiert. Die durch die sofort aus den Zellkernen der lysierten Zellen freigesetzte DNA zähflüssige Lösung wird aus der Flasche in einen Glashomogenisator überführt. Die Flasche wird einmal mit 5 ml Thiocyanatpuffer nachgespült. Durch mechanische Homogenisation der in Thiocyanatpuffer lysierten Zellen wird die DNA gesichert, um die Sedimentation der RNA durch das bei der anschließenden Zentrifugation entstehende DNA-Kissen zu erleichtern

3. 4. 2. RNA-Extraktion aus Gewebe

Die Versuchstiere werden bei Anzeichen klinischer Erkrankung durch Äther getötet. Die Präparation der Organe erfolgt direkt nach Eintritt des Todes. Die Organe werden entnommen und sofort bei -20° eingefroren. Die Präparation von gesamtzellulärer RNA erfolgt nach der Methode von Chirgwin (Chirgwin et al., 1979): Die Organe werden entweder direkt nach Entnahme oder in gefrorenem Zustand in 15 ml kaltem Thiocyanatpuffer (siehe 3. 4. 1.) im Potter-Homogenisator zerkleinert bis eine homogene Suspension entsteht. Diese wird anschließend durch die Zugabe von weiteren 10 ml Thiocyanatpuffer verdünnt, um die Sedimentation der RNA bei der Zentrifugation zu erleichtern.

3. 4. 3. Reinigung der RNA über einen CsCl-Gradienten

Die Zell- oder Gewebesuspensionen in Thiocyanatpuffer werden vorsichtig auf ein CsCl-Kissen der Dichte $1,7 \text{ g/cm}^3$ (in 25 mM Natriumcitrat pH 5,0, auf den Brechungsindex von 1,4 eingestellt) geschichtet, das je nach Wahl des Rotors und der Zentrifugenröhrchen 10 ml (für SW 28-Rotoren) bzw. 4,5 ml (für SW 41-Rotoren) beträgt. Die Zentrifugation erfolgt bei 24 000 rpm (im SW 28-Rotor) bzw. 32 000 rpm (im SW 41-Rotor) für 16 Stunden bei 20° .

Danach wird die als Überstand vorhandene Thiocyanatlösung abpipettiert. Die DNA erscheint als hochvisköse Phase im unteren Drittel des Gradienten und wird ebenfalls vorsichtig abgenommen und verworfen. Das Zentrifugenröhrchen wird entleert und auf den Kopf gestellt, um restliche Flüssigkeit ablaufen zu lassen.

Die als Sediment vorhandene RNA wird mehrmals mit 100 μl SEH 0,1%SDS (100 mM NaCl, 10 mM HEPES, 1 mM EDTA, 0,1% SDS) gelöst, mit 400 μl Chloroform/Butanol (4 : 1) extrahiert und 5 Min. in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert (Maniatis et al., 1982). Der wässrige Überstand wird in ein neues Eppendorffröhrchen überführt und die verbleibende organische Phase erneut mit 200 μl SEH 0,1% SDS extrahiert.

Die Überstände werden vereinigt und die RNA mit 2,5 Vol. Ethanol für 3 Stunden bei -20° ausgefällt. Danach wird die RNA für 30 Min. bei 4° in der Eppendorffzentrifuge bei 12 rpm zentrifugiert und in sterilem H_2O aufgenommen. Davon werden 5 μl für eine Adsorptionsmessung im UV (bei 260 nm und 280nm) in 200 μl H_2O verdünnt. Die restliche RNA wird sofort wieder mit 2,5 Vol. Ethanol ausgefällt. Bei RNA entspricht 1 OD (optische Dichte) bei 260 nm einer Konzentration von 40 μg RNA/ml. Bei reiner RNA sollte das Verhältnis der OD von 260/280 nm 1,8 bis 2,0 betragen. Kleinere Verhältnisse sprechen für Verunreinigungen durch Proteine. In diesem Falle sollte nochmals mit Chloroform/Butanol extrahiert werden.

3. 4. 4. +pA-Selektion von RNA

Die Methode erlaubt die Abtrennung polyadenylierter RNA (der mRNA) von nicht polyadenylierten RNAs (rRNAs, tRNAs und andere) aus Präparationen von gesamt-zellulärer RNA. Da die mRNA-Population nur einen kleinen Teil der gesamten RNA-Population der Zellen repräsentiert, stellt diese Methode einen Reinigungs- und Anreicherungsschritt für diese RNA-Fraktion

dar. Sie beruht auf der Basenpaarung zwischen den poly-A-Sequenzen am 3'-Ende der mRNAs und oligo-dT-Resten, die an eine feste Zellulose-Matrix gekoppelt sind. Nicht-polyadenylierte RNAs binden nicht und können leicht aus der Säule eluiert werden. Die gebundenen +pA-RNAs werden durch Erniedrigung der Salzkonzentration im Säulenpuffer aus ihrer Bindung an die Säule eluiert. +pA-RNA ergibt im Northern Blot ein besseres Signal als gesamte RNA und wird vor allem für in vitro Translationsexperimente in zellfreien Translations-systemen verwendet.

Für die oligo-dT-Säule werden 0,5 g oligo-dT-Zellulose in 0,5 ml 1 N NaOH und 0,5 ml ODT 1-Puffer (0,5 M NaCl, 10 mM Hepes pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8, 0,1% SDS) vorgequollen. Die Suspension wird blasenfrei in eine mit steriler Glaswolle abgedichtete, silikonisierte Pasteurpipette überführt und so lange mit ODT 1-Puffer äquilibriert, bis der pH des Eluats einen Wert von 7,4 erreicht. Die zu selektierende RNA wird in ODT 2-Puffer (10 mM Hepes pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8, 0,1% SDS) auf mindestens das Vierfache ihres Volumens verdünnt, 1 Min. bei 100° denaturiert und anschließend sofort auf Eis für 5 Min. abgekühlt. Nach Zugabe von 5 M NaCl-Lösung soll die Endkonzentration an NaCl 0,5 M betragen. Die RNA wird nun auf die Säule aufgetragen, das Eluat in einem Eppendorfröhrchen aufgefangen und nochmals über die Säule gegeben. Die Säule wird nun zweimal mit 100 µl ODT 1-Puffer nachgespült. Die +pA-Fraktion der RNA ist nun eluiert und wird unter Zugabe von 5 M NaCl (Endkonzentration: 10 mM) sofort mit Ethanol ausgefällt.

Die Säule wird nun mit 3 ml ODT 1-Puffer nachgewaschen. Die +pA-RNA wird von der Säule eluiert, indem zweimal mit 100 µl ODT 1-Puffer und viermal mit je 200 µl ODT 2-Puffer gespült wird. Die erhaltenen Fraktionen werden in einem Eppendorfröhrchen vereinigt und unter Zugabe von 5 M NaCl (Endkonzentration: 10 mM) mit Ethanol ausgefällt. Die Ausbeute an +pA-RNA beträgt etwa 2% der insgesamt eingesetzten RNA-Menge. Die +pA-RNAs werden bis unmittelbar vor ihrer Weiterverarbeitung unter Ethanol bei -20° aufbewahrt. Sie werden dann für 30 Min. bei 4° in der Eppendorffzentrifuge bei 12 rpm sedimentiert, mit 70% Ethanol nachgewaschen und im Wasserstrahlvakuum getrocknet. Die +pA-RNAs werden dann in sterilem H₂O so aufgenommen, daß eine Konzentration von 1 µg +pA-RNA/µl eingestellt wird.

3. 4. 5. Agarosegele zur Auftrennung von RNA

Für RNA-Größen von 1 - 5 kb wird ein 1%iges Agarosegel mit 6 % Formaldehyd in 1 x MOPS-Puffer (0,4 M Morpholinopropansulfonsäure, 100 mM NaOAc, 10 mM EDTA pH 8) gegossen. 10 ug +pA-RNA (+20 ug carrier tRNA) oder 30 ug gesamte RNA werden in Probenpuffer aufgenommen:

RNA	25 %
Formamid	50 %
10 x MOPS	10 %
Formaldehyd	15 %

(bezogen auf das Endvolumen) und in diesem Puffer für 15 Min. bei 65° im Wasserbad denaturiert. Die Mischung wird auf Eis für 5 Min. abgekühlt und mit 0,1 Vol. Farbpuffer (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol, 60% Glyzerin) versetzt und in 3 cm breite vorgeformte Geltaschen aufgetragen. Die Elektrophorese wird für ca. 4 Stunden bei 100 V pro 15 cm Gellänge durchgeführt. Dabei wird der Elektrophoresepuffer von + nach - umgepumpt, da die Pufferkapazität sonst nicht ausreicht, den pH-Wert an den Elektroden konstant zu halten.

Wird das RNA-Gel nicht für einen Northern Transfer verwendet, kann die RNA durch Anfärben des Gels für 3 Min. in Ethidiumbromid-Lösung (0,1 mg/ml) und anschließendes Entfärben für 60 Min. in H₂O sichtbar gemacht werden.

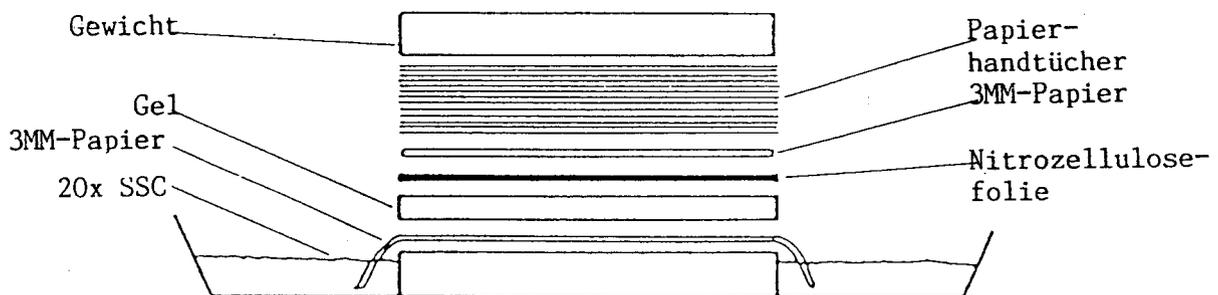
3. 4. 6. Northern Transfer von RNA

Vor dem Transfer der in einem denaturierenden formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennten RNA auf Nitrozellulosefolie wird das Gel zunächst für 5 Min. in H₂O gewaschen, um das Formaldehyd aus dem Gel zu entfernen. Anschließend werden, zum besseren Transfer vor allem größerer RNA-Moleküle, die auf dem Gel befindlichen RNAs durch alkalische Hydrolyse in 0,2 N NaOH für 15 Min. denaturiert. Die Neutralisation erfolgt danach in 250 mM Tris-HCl pH 7.2 für 20 Min. Zur Einstellung der für den Transfer geeigneten Salzkonzentration wird das Gel anschließend dreimal für 15 Min. in 20 x SSC (3 M NaCl, 0,5 M Natriumcitrat, pH 7,2) gewaschen.

Nitrozellulosefolie der Porengröße 0,45 um wird zunächst in H₂O, dann in 20 x SSC für mindestens 30 Min. vorgeweicht. Whatman 3MM-Papier, das RNA-Gel, die Nitrozellulosefolie, 3MM-Papier und ein Stoß Papierhandtücher werden übereinandergelegt und mit ca. 10 g/cm² Gel beschwert. Mit dem

20 x SSC wird die RNA in diesem Diffusionsblot auf die Nitrozellulosefolie gesaugt (Abb. 5). Dieser Prozeß ist nach 16 Stunden beendet. Anschließend werden auf der Nitrozellulosefolie die Positionen der Gelbegrenzungen und der Auftragstaschen markiert. Die Nitrozellulose wird dann für 2 Stunden im Vakuum bei 80° gebacken und anschließend bei 40 bis zur Hybridisierung aufbewahrt.

Abb. 5
Northern Transfer von RNA (Maniatis et al., 1982)



3. 5. Bakterien- und Phagenkultur

3. 5. 1. Bakterienkultur

Für die meisten gentechnologischen Verfahren werden mutierte *E. coli* K 12 -Stämme verwendet, die vor allem speziellen Klonierungsverfahren gerecht werden (Winnacker, 1984). Für die Vermehrung der unter 2. 8. beschriebenen MV-spezifischen Fragmente in Gemini-Plasmiden werden Bakterien der Stämme HB 101 und JM 83 verwendet, die beide in YT-Kulturmedium (8 g/l Bacto-Trypton, 5 g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl) gezüchtet werden, das entweder in Agarplatten gegossen oder als Flüssigmedium gebraucht wird.

Für die Vermehrung von M13-Phagen (Messing et al. 1979) eignet sich der Bakterienstamm JM 103. Dieser enthält kodiert den F-Faktor für die Ausbildung von Sex-Pili, die den Phagen

die Adsorption an die Bakterienoberfläche ermöglichen. Auf die Fähigkeit, F-Faktor zu bilden, wird durch die Wachstumsfähigkeit der Bakterien in Minimalmedium selektioniert, da in Verbindung mit dem F-Faktor das intakte proA+B⁺-Allel vorhanden ist, das die Bakterien unabhängig von externem Prolin macht.

Deshalb werden JM 103-Bakterien auf Minimalplatten(1,5% Agar, 10% M9-Salze (60g/l Na₂HPO₄, 30 g/l KH₂PO₄, 10 g/l NH₄Cl, 5 g/l NaCl), 10 mM MgSO₄, 1 mM CaCl₂, 10 mM Thiamin-HCl, 2% Glucose) ausgestrichen. In Flüssigkultur wird ebenfalls YT-Medium verwendet.

Bakterien können mit einer ausgeglühten Platinöse auf den geeigneten Agarplatten ausgestrichen oder mit Topagar ausplattiert werden. Sie wachsen bei 37°, in Flüssigkultur unter heftigem Schütteln, um ausreichend Sauerstoffzufuhr zu gewährleisten.

Geringe Mengen einer stationären Kultur können mit 50% Glycerin oder 7% DMSO bei -70° aufbewahrt werden; auf Agarplatten halten sie sich etwa 4 Wochen im Kühlschrank.

3. 5. 1. 1. Herstellung kompetenter Bakterien

500 ml YT-Medium werden mit 5 ml einer Vorkultur von JM 103 oder JM 83 angeimpft und heftig bei 37° geschüttelt. Bei einer OD₆₀₀ von 0,4 werden die Bakterien auf Eis abgekühlt. Von nun an werden alle Lösungen und Pipetten auf Eis vorgekühlt verwendet.

Die Bakterien werden für 10 Min. bei 6000 rpm bei 4° im GS 3-Rotor in der vorgekühlten Sorvall-Zentrifuge sedimentiert. Das Sediment wird in 150 ml 0,1 M MgCl₂ suspendiert und anschließend für 10 Min. bei 6000 rpm abzentrifugiert. Das Pellet wird in 250 ml 0,1 M CaCl₂ resuspendiert und unter gelegentlichen leichtem Schütteln für 30 Min. auf Eis inkubiert. Die Bakterien werden anschließend für 10 Min. bei 6000 rpm und 4° im GS 3-Rotor abzentrifugiert. Das Sediment wird in 15 ml 0,1 M CaCl₂ , 15% Glycerin resuspendiert und in 300 µl-Portionen bei -110° eingefroren.

Jede Präparation kompetenter Bakterien sollte auf Kompetenz mit einem bekannten Plasmid und auf Kontaminationen getestet werden.

3. 5. 1. 2. Transformation von Bakterien mit Plasmiden

300 μ l kompetente Bakterien werden noch nicht ganz aufgetaut zusammen mit 2 ng Plasmid-DNA für 40 Min. unter gelegentlichem leichtem Schütteln auf Eis inkubiert. Nach 90 sec. Temperaturschock bei 42° läßt man die Mischung für 5 Min. auf Raumtemperatur abkühlen und gibt dann 1 ml YT-Medium zu. Anschließend werden die Bakterien in der Eppendorffzentrifuge für 5 Min. bei 6000 rpm abzentrifugiert und in 300 μ l YT resuspendiert.

Davon werden 10, 50 und 240 μ l in je 3ml flüssigen 42° warmen Topagar (0,7% Agar in YT) mit dem entsprechenden Antibiotikum zur Selektion pipettiert und die Mischung auf je eine vorgewärmte Agar-Platte (1,5% Agar in YT) der entsprechenden Resistenz ausplattiert.

Nach 5 Min. ist der Topagar fest und die Bakterienplatten werden über Nacht im Bakterienbrutschrank bei 37° inkubiert. Nach dem Auswachsen der Klone werden die Bakterienplatten mit Parafilm verschlossen und im Kühlschrank aufbewahrt.

3. 5. 2. Phagenkultur

3. 5. 2. 1. Transformation von Bakterien mit M13-DNA

Eine Vorkultur von JM 103 wird in 2 x YT (16 g/l Bacto-Trypton, 10 g/l Hefe-Extrakt, 10 g/l NaCl) wird ca. 2 Stunden bei 37° geschüttelt.

Parallel dazu werden 300 μ l kompetente JM 103 mit 5 ng M13-DNA zusammenpipettiert und für 30 Min. auf Eis unter gelegentlichem Schwenken inkubiert. Anschließend erfolgt der Temperaturschock für 2 Min. bei 42°, das Abkühlen der Mischung auf Raumtemperatur für 5 Min. und die Zugabe von 1 ml YT-Medium. Die Mischung wird für 5 Min. in der Eppendorffzentrifuge bei 6000 rpm abzentrifugiert und das Sediment in 200 μ l YT-Medium resuspendiert. Davon werden jeweils 50 und 150 μ l in je 3ml flüssigen Topagar bei 42° pipettiert. Weiterhin werden zu dieser Mischung noch 200 μ l logarithmisch wachsende JM 103-Bakterien aus der Vorkultur gegeben. Der Topagar wird auf vorgewärmten YT-Platten ausplattiert. Diese werden über Nacht im Bakterienbrutschrank inkubiert. Die Fremd-DNA enthaltenden Bakterienkolonien erscheinen als weiße Plaques in einem gleichmäßigen Rasen von JM 103-Bakterien.

3. 5. 2. 2. Präparation von Einzelstrang M13-DNA

Eine Vorkultur von JM 103-Bakterien wird über Nacht bei 37° im Schüttelinkubator gezüchtet.

Zu je 10 ml YT in 100 ml Erlenmeyerkölbchen werden 200 µl der Vorkultur pipettiert. Die Bakterien werden mit einem Plaque der Transformation, isoliert mit einer sterilen Pasteurpipette, oder 50 µl infektiösem Phagenüberstand infiziert und für vier Stunden bei 37° heftig geschüttelt.

Anschließend werden die Bakterien für 10 Min. bei 8000 rpm bei 4° im SS34-Rotor in der Sorvall-Zentrifuge abzentrifugiert. 8 ml des Überstands werden abpipettiert und in ein neues 10 ml Zentrifugenröhrchen überführt, der Rest des Überstands wird als infektiöser Phagenüberstand im Kühlschrank aufbewahrt. Das Bakterienpellet wird verworfen.

Die 8 ml Überstand werden für die Präparation der einzelsträngigen M13-Phagen-DNA mit 1,6 M. 25% PEG, 3 M NaCl für eine Stunde auf Eis inkubiert und anschließend für 20 Min. bei 10000 rpm bei 4° im SS34-Rotor zentrifugiert. Das Sediment wird getrocknet und in 400 µl TE (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 50 mM EDTA pH 8) aufgenommen. Die DNA wird anschließend einmal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert und danach mit 0,1 Vol NaOAc pH 5,2 in 2,5 Vol Ethanol ausgefällt. Die Konzentrationsmessung erfolgt im UV (260/280 nm) mit dem Umrechnungsfaktor für Einzelstrangnukleinsäuren wie für die RNA (1 OD = 40 µg/ml).

3. 6. Plasmidpräparation

Für die Plasmidpräparation aus den E. coli-Stämmen JM 83, HB 101 oder JM 103 wird YT-Medium verwendet (8 g/l Bacto-Trypton, 5g/l Hefe-Extrakt, 5 g/l NaCl).

Eine Vorkultur (20 ml YT) wird mit einer Bakterienkolonie angeimpft und über Nacht bei 37° geschüttelt. Das Medium enthält je nach Resistenz des Plasmides 40 mg/l Ampicillin oder 15 mg/l Tetracyclin.

Mit 1 ml dieser Vorkultur wird 1 l Medium mit dem entsprechenden Antibiotikum angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ von 0,5 bei 37° geschüttelt.

Mit der Aufarbeitung wird durch die Zentrifugation der Bakterienkultur für 10 Min. bei 5000 rpm bei 4° im GS 3-Rotor in der Sorvall-Zentrifuge begonnen. Das Sediment wird in 20 ml (Endvolumen) ST (15% Saccharose, 50 mM Tris pH 8) resuspendiert und in 40 ml Zentrifugenröhrchen überführt.

2 ml einer frisch angesetzten Lysozymlösung (5 mg/ml in ST) werden zugegeben und die Mischung für 2 Min. auf Eis inkubiert. Nach der Zugabe von 3 ml EDTA (0,5 M, pH 8) wird weitere 10 Min. auf Eis inkubiert, danach noch einmal 5 Min. nach dem Zusatz von 5 ml 2% Sarkosyl zu der Bakteriensuspension. Diese wird anschließend für 60 Min. bei 18000 rpm im SS34-Rotor bei 4° zentrifugiert.

Der dünnflüssige Überstand wird in ein 40 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 15 Min. bei 37° mit 100 µl RNase A (100mg/ml) verdaut.

Nach anschließender Zugabe von 0,2 Vol 5 M NaCl und 0,33 Vol 30% PEG wird der Überstand für mindestens zwei Stunden auf Eis inkubiert.

Nach der Zentrifugation für 20 Min. bei 10000 rpm im SS34-Rotor bei 4° wird das Sediment getrocknet und in 3 ml TE aufgenommen.

Die DNA-Lösung wird nun einmal mit Phenol und einmal mit Chloroform extrahiert und nach Zugabe von 0,1 Vol NaOAc pH 5,2 mit 2,5 Vol Ethanol ausgefällt.

Nach dem Abzentrifugieren der Plasmid-DNA für 30 Min. bei 10000 rpm wird diese einmal mit 70% EtOH gewaschen, getrocknet und in TE aufgenommen. Ein Aliquot von 5 µl wird für die Konzentrationsmessung im UV bei 260 nm verwendet. Für DNA gilt: 1 OD = 50 µg DNA/ml.

3. 7. Reinigung der Plasmid-DNA über einen CsCl-Gradienten

Zur Trennung von "supercoiled" Plasmid-DNA von Plasmiden mit Einzelstrang- oder Doppelstrangbrüchen und restlicher zellulärer DNA und RNA wird die Plasmid-DNA über einen CsCl-Gradienten gereinigt.

8,53 g CsCl, 6,4 ml TE, 1,8 ml Plasmid-Lösung in TE und 200 µl Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) ergeben ca. 10 ml Lösung mit einem Brechungsindex von 1,3920. Diese wird auf zwei Röhrchen für den Vertikalrotor ViTi.65 verteilt. Die Röhrchen werden blasenfrei gefüllt und anschließend zugeschmolzen. Die Zentrifugation erfolgt bei 45000 rpm für 18 Stunden bei 20° im Vertikalrotor. Die Zentrifuge wird ohne mechanische Bremse gestoppt. Die Plasmidbande, die im UV sichtbar ist, wird mit einer 2 ml-Spritze aus dem Zentrifugenröhrchen abgezogen.

Zur Entfernung des CsCl und des Ethidiumbromids wird die abgezogene Plasmidlösung 5 x mit Isopropanol (NaCl-gesättigt) ausgeschüttelt. Der Überstand wird auf das 3-fache Volumen mit TE verdünnt und die DNA mit 2,5 Vol. EtOH ausgefällt.

3. 8. Spaltung von Plasmid-DNA mit Restriktionsenzymen

Für die Transkription markierter und nichtmarkierter RNAs durch Benutzung der Promotoren in den Gemini-Plasmiden müssen diese, da sie keine spezifischen Terminationssequenzen für die benutzten Polymerasen besitzen, durch Restriktionsspaltung an geeigneten Schnittstellen hinter dem einklonierten MV-spezifischen Fragment linearisiert werden.

Die zu spaltende DNA wird im Spaltungsansatz mindestens auf das Vierfache ihres Volumens verdünnt.

Das Ansatzvolumen ist außerdem abhängig von der verwendeten Enzymvolumenmenge, da die Restriktionsenzyme in glyzerinhaltigen Puffern aufbewahrt werden. Glycerin führt in hohen Konzentrationen zu unspezifischen Spaltungen. Somit sollte das Volumen des Restriktionsansatzes mindestens das Zehnfache der Enzymvolumens sein.

Die notwendigen Einheiten Enzym werden nach der zu spaltenden DNA-Menge berechnet (üblicherweise werden 4U/ug DNA verwendet). Die Restriktionspuffer sind für jedes Enzym angegeben, meist läßt sich jedoch mit standardisierten Puffern spalten (Maniatis et al., 1982).

DNA (in H ₂ O oder TE)	1/4 Vol.
10 x Puffer	1/10 Vol.
BSA	1/10 Vol.
Enzym	1/10 Vol.
H ₂ O	

Die Vollständigkeit der Spaltung wird auf Miniagarosegelen, auf denen gleichzeitig Größenmarker aufgetragen werden, überprüft.

3. 9. Agarosegele zur Auftrennung von DNA

Für Plasmid-DNA mit Fragmentgrößen von 10 kb bis 200 bp werden 1 bis 2%ige Agarosegele mit 20 ul Ethidiumbromid (10 mg/ml) pro 100 ml Gel in 1 x TAE (40 mM Tris Acetat pH 8, 2 mM EDTA) verwendet. Ca. 0,3 g DNA pro erwartete Bande in TE

wird mit 0,1 Vol. 10 x TAE, 0,1 Vol 10 x Farbpuffer (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol, 60% Glyzerin) gemischt, aufgetragen und die Elektrophorese 4 Stunden bei 100 Volt oder über Nacht bei 25 Volt durchgeführt.

Für Miniagarosegele wird derselbe Standardansatz wie beschrieben benutzt, jedoch werden nur 30 ml Gel benötigt.

3. 10. Radioaktive Markierung der verwendeten Proben

3. 10. 1. Endmarkierung von ds-DNA mit 5'-überhängenden Enden

Durch geeignete Restriktionsspaltung entstandene 5'-überhängende Enden können durch Zugabe von entsprechenden Nukleotiden, von denen eines ^{32}P -markiert ist, und Klenow-Fragment der DNA-Polymerase I (5'-3'-Polymeraseaktivität und "Proofreading"-Aktivität) aufgefüllt und somit radioaktiv markiert werden.

DNA (Fragment oder restriktions-gespaltene Plasmid)	1 ug
10 x Nicktranslations-Puffer (0,5 M Tris-HCl pH 7,2, 100 mM MgSO_4 , 1 mM DTT, 500 ug/ml BSA)	2,5 ul
dNTP s (Stocklösung: je 0,5 mM	3 x 4 ul
α - ^{32}P -dNTP	2,5 ul
Klenow-Polymerase	2,5 U
H_2O	ad 25 ul

Die Inkubation der Reaktion erfolgt bei Raumtemperatur für 45 Min. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 0,5 M EDTA pH 8 (Endkonzentration: 10 mM) beendet. Die Reinigung der markierten DNA erfolgt durch Extraktion mit 1 Vol. Phenol. Nach der Extraktion wird die wässrige Phase bei Zugabe von 5 M NaCl (Endkonzentration: 10 mM) mit Ethanol bei -20° für 3 Stunden ausgefällt, anschließend für 30 Min. im Kaltraum in der Eppendorffzentrifuge zentrifugiert, mit 70% Ethanol nachgewaschen, getrocknet und in sterilem H_2O aufgenommen.

1 ul der in der Lösung befindlichen DNA wird entnommen und im Szintillationszähler zur Bestimmung der eingebauten Radioaktivität gemessen.

3. 10. 2. In vitro Markierung von ds-DNA durch "Nick Translation"

Für die in situ Hybridisierung (siehe 3. 15.) werden MV-spezifische DNA-Fragmente von ca. 600 bp Länge mit ^{35}S -dATP markiert. Hierbei werden beide Stränge einer ds-DNA über das gesamte Molekül hinweg in zufälliger Verteilung markiert.

DNA-Fragment	0,3 ug
10 x Nicktranslations-Puffer	5 ul
dGTP, dTTP, dCTP (je 0,5 mM)	3 x 2 ul
dATP (0,025 mM)	2 ul
α - ^{35}S -dATP (50 uCi, 400 Ci/ mmol)	5 ul
H ₂ O	ad 46 ul
DNase I (1 : 10000 in H ₂ O)	2 ul
DNA-Polymerase I	5 U

Die Reaktion erfolgt für 2 Stunden bei 14^o im Wasserbad im Kaltraum und wird anschließend durch die Zugabe von 0,5 M EDTA (Endkonzentration 10 mM) und 50 ul SEH 0,1% SDS (100 mM NaCl, 10 mM Hepes, 1 m M EDTA) beendet.

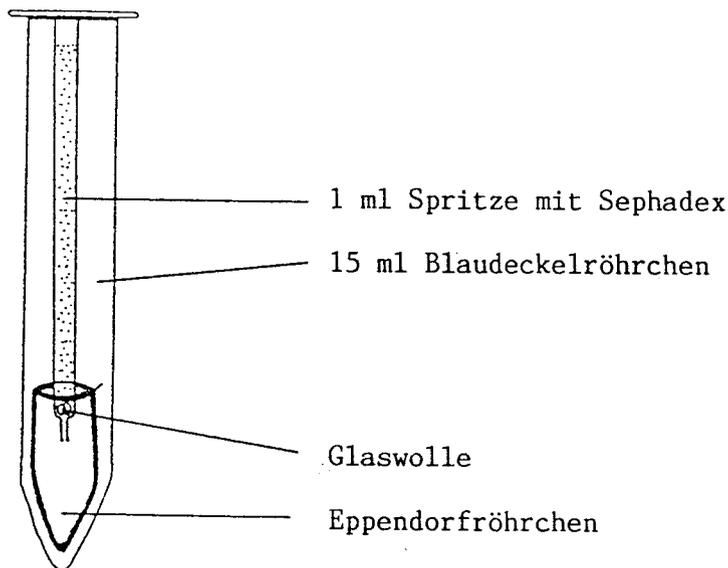
Die nicht eingebauten radioaktiven Nukleotide werden durch Zentrifugation durch eine Sephadex G-50-Säule von der markierten Probe abgetrennt (Maniatis et al., 1982).

Dafür wird das in SEH vorgequollene Säulenmaterial in eine 1 ml Plastik-Spritze gefüllt und die Flüssigkeit in ein Eppendorfgefäß für 4 Min. bei 167 g (1000 rpm in der Hettichzentrifuge) hindurchzentrifugiert. Das Eppendorfgefäß wird nun ausgewechselt. Die 100 ul Lösung aus dem in vitro-Markierungsansatz werden nun durch das trockene Säulenmaterial für 4 Min. bei 1000 rpm zentrifugiert (Abb. 6).

Das Eppendorfgefäß enthält danach die markierte Probe in 100 ul SEH. 1 ul davon wird entnommen und im Szintillationszähler nach Zugabe von 5 ml Szintillationsflüssigkeit gezählt.

Abb. 6

Abtrennung nichteingebauter radioaktiver Nukleotide von der markierten Probe mittels Zentrifugation durch eine Sephadex SG-50-Säule (Maniatis et al., 1982)



3. 10. 3. Markierung von ss-DNA durch "Primer Extension"

Klonierte ss-M13-DNA wird in einer sogenannten "Primer Extension"- Reaktion unter Verwendung eines synthetischen 15 b langen Oligomers komplementär zu Primer-Bindungsstelle, dreier nichtmarkierter und eines markierten Nukleotids radioaktiv markiert. Dabei entstehen einzelsträngige DNA-Proben, die über ihre ganze Länge markiert sind und deren Orientierung komplementär zu der des klonierten spezifischen Fragments ist. Die Markierungsstrategie ist in Abb. 7 A - F schematisch dargestellt.

Die Synthese der radioaktiven Probe beginnt mit der "Annealing"-Reaktion:

ssM13-DNA mit spezifischem Insert	100 ng
Primer (15 b Sequenzier-Primer, Pharmacia)	4 ul
10 x Annealing Puffer (100 mM Tris-HCl pH 7,4, 100 mM MgCl ₂)	1,5 ul
H ₂ O	ad 15 ul

Die Reaktionsmischung wird für 10 Min. bei 60° denaturiert und anschließend für 30 Min. auf Raumtemperatur abgekühlt. Dabei hybridisiert der Primer vor der multiplen Klonierungsstelle von M13 an die ssDNA (Abb. 7 A).

Die "Primer Extension"-Reaktion erfolgt nach der Abkühlung der "Annealing"-Reaktion:

α - ³² P-dATP (30 uCi, 3000 Ci/mmol)	3 ul
DNA-Polymerase Klenow-Fragment	5 U
Synthese-Puffer (dTTP, dCTP, dGTP je 0,5 mM in 50 mM Tris pH 8, 1mM EDTA)	2 ul

Die Reaktion wird für 15 Min. bei 28° im Wasserbad inkubiert (Abb. 7 B). Anschließend wird nach der Zugabe von 2 ul Chase Puffer (0,5 mM dCTP, dGTP, dTTP, dATP in 50 mM Tris pH 8, 1mM EDTA) nochmals für 15 Min. im Wasserbad bei 28° weiterinkubiert. Die Reaktion wird durch die Zugabe von 70 ul SEH beendet.

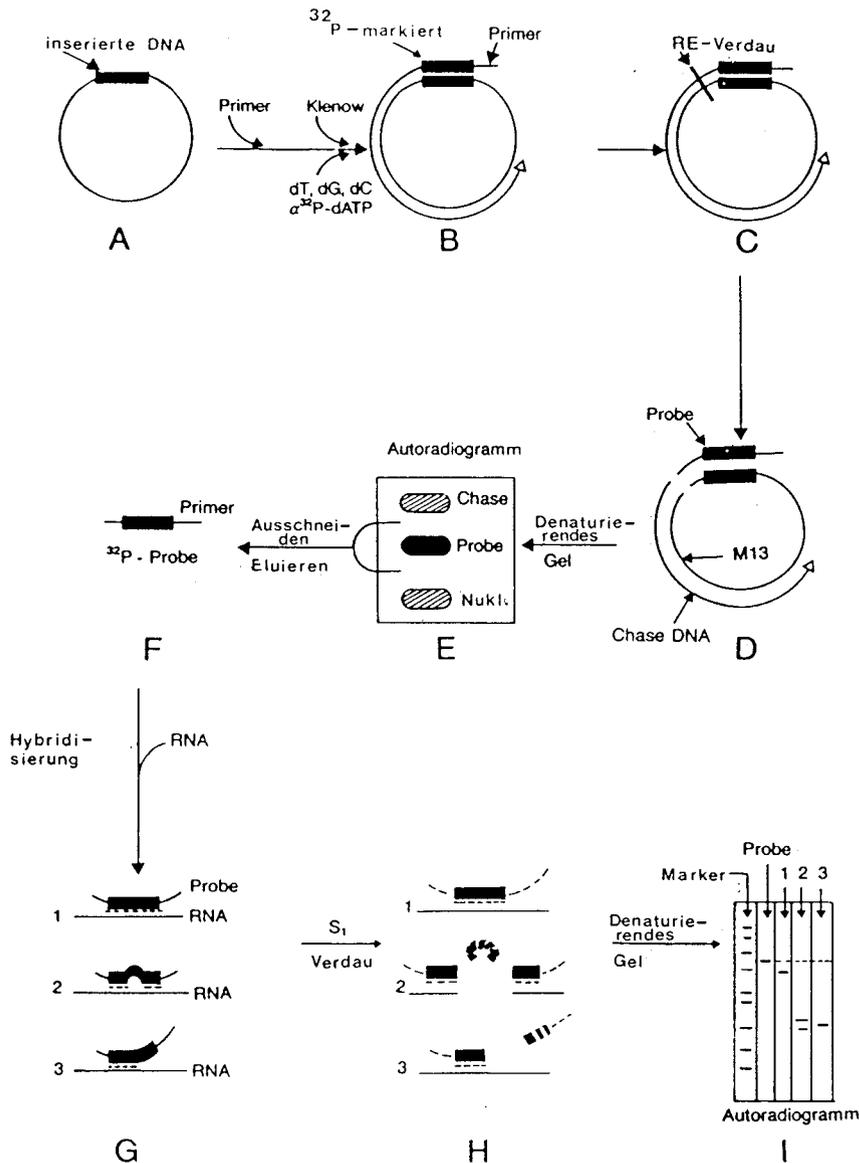
Danach erfolgt die Restriktionsspaltung (Abb. 7 C): 10 ul Restriktionsenzym-puffer für Eco RI (für M13 mp8) oder Hind III (für M13 mp9) und das jeweilige Enzym (25 U) werden zugegeben. Der Verdau erfolgt für 1 Stunde bei 37° (Abb. 7 D). Die Spaltung wird durch 100 ul SEH und anschließende Phenolextraktion beendet.

Die wässrige Phase wird nach Zusatz von 2 ul carrier tRNA (10 mg/ml) mit 2,5 Vol Ethanol gefällt.

Die radioaktiv markierte Probe wird nach 20 Min. Zentrifugation getrocknet und in 12 ul Probenpuffer (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol, 0,01 M EDTA, 50%Formamid) aufgenommen, 2 Min. bei 100° denaturiert und über ein 8%iges Acrylamidgel mit 7% Harnstoff von dem M13-Template und den nicht eingebauten Nukleotiden abgetrennt (Abb. 7 E).

Abb. 7

Darstellung der radioaktiven Markierung von ss-M13-DNA, der Reinigung der einzelsträngigen Hybridisierungsprobe und deren Flüssigphasenhybridisierung im sogenannten Nuklease-S1 Kartierungsexperiment.



Die experimentellen Bedingungen der Markierung mittels einer "primer extension"-Reaktion (3. 10. 3.) und der Flüssighybridisierung (3. 13.) sind im Text beschrieben, die Sensitivität der Methode ist im Ergebnisteil unter 4. 1. 2. ausgetestet und beschrieben. (Abb. nach Davis et al., 1986)

50 ml Gelansatz enthalten:

21 g Harnstoff

20 ml H₂O

5 ml 10 x TBE (108 g/l Tris, 55 g/l Borsäure, 40 ml/l 0,5 M EDTA pH 8)

10 ml 38% Acrylamid + 2% Bisacrylamid-Lösung

Diese Mischung wird gerührt, bis sich der Harnstoff gelöst hat und anschließend für 10 Min. im Wasserstrahlvakuum evakuiert. Zur Polymerisation werden 45 µl TEMED und 200 µl 10% Ammoniumpersulfat (frisch angesetzt) zugegeben.

Das Gel ist nach etwa 2 Stunden polymerisiert und wird ohne Auftrag der Probe bei 40 Watt, 1500 Volt und 28 mA auf etwa 60° vorgewärmt.

Die denaturierte Probe wird danach aufgetragen. Die Elektrophorese wird unter oben genannten Bedingungen in 1 x TBE für etwa 1,5 Stunden durchgeführt.

Das Gel wird für etwa 2 Min. an einen Cronex 2 Röntgenfilm angelegt, um die genaue Position der markierten Probe im Gel zu bezeichnen. Die entsprechende Bande wird mit einem sterilen Skalpell ausgeschnitten und in ein Eppendorfgefäß überführt.

Mit 2 x 200 µl Extraktionspuffer (0,5 M NaOAc pH 7, 1mM EDTA, 0,1% SDS) wird 2 x 30 Min. bei 37° unter gelegentlichen Vortexen extrahiert (Abb. 7 F). Die Überstände werden vereinigt und mit 10 µl carrier tRNA versetzt. Nach einer Extraktion mit einer Phenol/Chloroform-Mischung (1 : 1) wird die markierte Probe in Ethanol ausgefällt.

Nach der Zentrifugation wird das Sediment trocken im Szintillationszähler gemessen.

3. 10. 4. In vitro Transkription markierter RNA-Proben

Die Polymerasen der Bakteriophagen SP 6 und T7 besitzen eine hohe Spezifität für ihre Promotoren. Diese Eigenschaft wird für die Transkription spezifischer RNA-Proben ausgenutzt, die von einem zwischen die beiden Promotoren in die multiple Klonierungsstelle des Plasmids Gemini-1 spezifischen DNA-Fragment mit hoher Effizienz abgelesen werden können (Melton et al., 1984, Krieg und Melton, 1984). Um einen definierten Transkriptionsstop zu haben, werden die Plasmide vor der Transkription 3' des Fragments linearisiert (siehe unter 2. 8. 2.). Dabei ist darauf zu achten, daß kein Restriktionsenzym

verwendet wird, das 3' -überhängende Enden produziert, da diese die Polymerase dazu veranlassen, die Transkripte in verkehrter Orientierung abzulesen.

Die Gemini-Vektoren besitzen den Vorteil, an beiden Seiten der multiplen Klonierungsstelle einen Phagenpromotor zu haben. So kann durch die Wahl der Polymerase die Orientierung der transkribierten RNA bestimmt werden.

Durch die Transkription in Gegenwart eines markierten Nukleotids (entweder ^{32}P -rCTP oder ^{35}S -rUTP) lassen sich markierte RNA-Proben von hoher spezifischer Aktivität herstellen, die als strangspezifische Hybridisierungsproben für Northern Blots und in situ Hybridisierungen verwendet werden können.

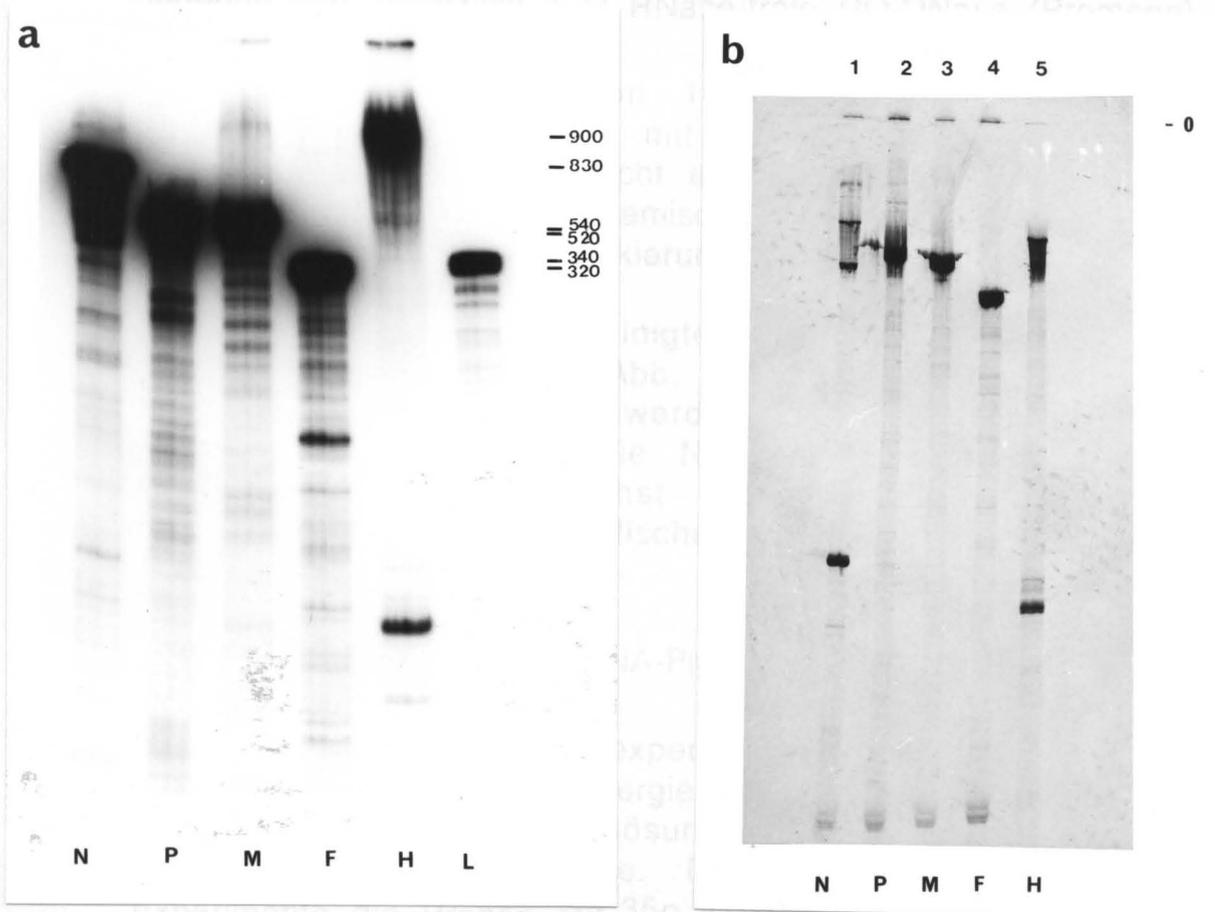
3. 10. 4. 1. Markierung von RNA-Proben mit ^{32}P -rCTP

Für Northern Blot Hybridisierungen werden die unter 2. 8. 2. abgebildeten MV-Gem-1-Klone mit geeigneten Restriktionsenzymen linearisiert und in Gegenwart von ^{32}P -rCTP und der jeweils geeigneten Polymerase markiert. Die Wahl von rCTP als markiertem Nukleotid ist essentiell, da sowohl der M- als auch der F-spezifische Klon lange GC-reiche Sequenzen enthalten und sich komplementär zur mRNA-Orientierung nur mit diesem Nukleotid gut markieren lassen.

10 x Transkriptionspuffer (0,4 M Tris-HCl pH 7,4, 60 mM MgCl_2 , 100 mM DTT, 20 mM Spermidin)	2,5 ul
RNase Inhibitor (Promega, 40 U/ul)	1 ul
5 x rNTP ohne rCTP (2,5 mM rATP, rGTP, rUTP in H_2O)	5 ul
linearisierte DNA	3 ug
0,5 M DTT (in H_2O)	0,5 ul
α - ^{32}P -rCTP (30 uCi, 400 Ci/mmol)	3 ul
Polymerase (SP 6 oder T 7)	10 U
H_2O	ad 50 ul

Da im Puffer eine hohe Konzentration an Spermidin und DTT enthalten ist, die die DNA ausfällen könnten, wird das Wasser beim Zusammenmischen der Reaktionskomponenten vorgelegt. Die einzelnen Komponenten werden bei Raumtemperatur (nicht auf Eis) zusammengemischt.

Abb. 8
Darstellung der in vitro synthetisierten und markierten RNA-
Proben



Die unter 2. 8. 2. dargestellten MV-pGem1-Plasmide wurden unter Verwendung geeigneter Restriktionsenzyme linearisiert. Die anschließend in vitro synthetisierten, radioaktiv markierten RNA-Transkripte sind - der MV-Genordnung (siehe Abb. 1a) folgend - dargestellt.

Aliquots der in vitro ^{32}P -CTP-markierten (Abb. 8a) und der ^{35}S -UTP-markierten (Abb. 8b) Transkripte wurden hier über jeweils ein 8%iges, denaturierendes harnstoffhaltiges Polyacrylamidgel (3. 8. 3.) aufgetrennt, die Größen der Hauptbanden sind in Abb. 8a in Basen angegeben. Für alle Proben treten in (a) und (b) als Nebenprodukte der Reaktion vorzeitig beendete RNA-Transkripte auf, die als Schar schneller wandernder Banden unterhalb der Hauptbanden zu sehen sind. Die Klone pGemN und pGemH (jeweils Spur 1 und 4 in Abb. 8a und b) enthalten möglicherweise zusätzlich Stop-Sequenzen für die Sp6-Polymerase.

Die Synthese der radioaktiven Transkripte erfolgt für 60 Min. bei 37° im Wasserbad.

Der Transkriptionsreaktion folgt ein Verdau der Vektor-DNA. Hierfür werden zunächst 75 µl SEH zur Reaktionsmischung gegeben und zusätzlich 1 U RNase-freie RQ-DNase (Promega) pro µg Vektor-DNA.

Nach einer Inkubation von 15 Min. bei 37° wird die Reaktionsmischung einmal mit 1 Vol Phenol extrahiert. Anschließend werden die nicht eingebauten Nukleotide durch Zentrifugation des Reaktionsgemisches durch eine Sephadex G-50-Säule (siehe in vitro Markierung) von der markierten RNA-Probe abgetrennt.

So synthetisierte und gereinigte markierte Transkripte der MV-Gem-1-Klone sind in Abb. 8 a dargestellt. Nach der beschriebenen Reinigung werden die Proben direkt im Hybridisierungspuffer für die Northern Blot Hybridisierung aufgenommen und möglichst sofort hybridisiert, da sie aufgrund ihrer hohen spezifischen Aktivität nicht länger als einen Tag stabil sind.

3. 10. 4. 2. Markierung der RNA-Proben mit ³⁵S-rUTP

Für in situ Hybridisierungsexperimente sind ³²P-markierte RNA-Proben aufgrund der energiereichen Strahlung des Isotops nicht geeignet, da die Auflösung der positiven Signale im Gewebe zu schlecht wäre. Deshalb werden für diese Experimente die Proben mit ³⁵S-rUTP markiert. Die Synthese der RNA-Transkripte erfolgt analog dem für die ³²P-Markierung beschriebenen Protokoll mit Ausnahme der Mischung der nichtmarkierten Nukleotide, die in diesem Falle alle vier rNTPs in gleicher Konzentration enthält. Zusätzlich wird das markierte Nukleotid in einer Konzentration von 12 µM zugegeben. Die SP 6 und die T 7 Polymerase haben eine geringe Affinität für das angebotene Thioanalog, welches nur sehr schlecht eingebaut wird. Somit kommt es in Abwesenheit nichtmarkierten rUTPs zu einer hohen Rate von frühzeitigen Transkriptionsterminationen. Die Zugabe des nichtmarkierten rUTPs führt zwar zu einer Erniedrigung der spezifischen Aktivität der synthetisierten Probe, erlaubt jedoch die Synthese relativ einheitlicher Transkripte, die in Abb. 8b dargestellt sind.

Die Aufreinigung der Transkripte erfolgt ebenfalls durch die Zentrifugation durch eine Sephadex G-50-Säule.

3. 11. Transkription von pGem-MV-DNAs zur Herstellung nichtmarkierter Standard-RNAs

3. 11. 1. Synthese der Standard-RNA-Transkripte

Zur Herstellung von RNA-Standards, die spezifisch für jedes einzelne Gen sind, werden die in 2. 8. abgebildeten und beschriebenen pGem-Klone in mRNA-Orientierung in Gegenwart aller vier Ribonukleotide transkribiert.

Der Transkriptionsansatz wird in diesem Fall in einem Endvolumen von 100ul angesetzt:

5 x Transkriptionspuffer	20 ul
5 x rNTP-Mix (2,5 mM jedes rNTP)	20 ul
ca. 100 000 cpm ³² P-rCTP	1 ul
linearisierte Matrizen-DNA	2 ug
100 mM DTT	10 ul
RNAsin (25U/ul)	4 ul
Sp6- bzw. T7-Polymerase	20 U
H ₂ O	ad 100 ul

Die Inkubation und der anschließende DNase-Verdau werden entsprechend der radioaktiven Markierung (3. 10. 4. 1.) durchgeführt. Anschließend wird 1/50 Vol. Pronase (20 mg/ml), 1/40. Vol. 20% SDS und 5 ug Carrier-DNA dazugegeben und für 15 Min. bei 37° inkubiert. Nach einmaliger Extraktion mit Phenol/Chloroform (1:1) erfolgt die Reinigung der synthetisierten Transkripte auf einer Sephadex G-50-Säule. Aufgrund der schwachen radioaktiven Markierung der Transkripte lassen sich die gewünschten Fraktionen nach der Säulenreinigung im Szintillationszähler bestimmen. Diese werden unter Zugabe von 5 M NaCl (Endkonzentration: 10 mM) in 2,5 Vol. Ethanol ausgefällt. Nach Lösen in 100 ul H₂O wird nach Berechnung eine Endkonzentration von 0,01 pmol/ul eingestellt. Zur Stabilisierung der hergestellten Transkripte wird 10 mM DTT, 1 mM EDTA und Carrier-RNA (50ng/ul) zugegeben.

3. 11. 2. Konzentrationsbestimmung der Standard-RNA-Präparate

Die unter 3. 11. 1. synthetisierten Transkripte werden nach der Ethanolpräzipitation auf 0,01 pmol/ul eingestellt. Hierzu wird die folgende Berechnung angestellt, die verdeutlichend am Beispiel der pGem-MV-N-RNA beschrieben werden soll. Wie

unter 3. 11. 1. angegeben, wird zur Herstellung der RNA wenig markiertes rCTP zusammen mit einer nicht limitierenden Konzentration an nicht markiertem rCTP (500 μ M) in die Reaktion eingesetzt. Anhand der spezifischen Aktivität des gesamten verwendeten rCTP kann der Einbau des rCTP in % berechnet werden:

Eingesetzt werden 130 000 cpm (1 μ l) = 100%

Eingebaut werden 18 719 cpm = 14,4%

Da die Endkonzentration des rCTP im Ansatz 500 μ M ist, d. h. 100 μ l 50000 pmol zur Verfügung stehen, gilt:

angeboten 100% = 50000 pmol

eingebaut 14,4% = 7200 pmol

In dem 850 Basen langen N-Transkript können 212 rCTP eingebaut werden. Daraus kann eine Zahl von 62,3 pmol synthetisierten Transkripten berechnet werden. Diese Menge, die in 100 μ l H₂O gelöst ist, kann nun auf die Endkonzentration von 0,01 pmol/ μ l eingestellt werden.

3. 11. 3. Untermischen der Standard-RNA-Präparate unter die RNA-Präparate für Northern Blots

Unter die gesamte im Northern Blot zu analysierende RNA werden als interner Standard vor der Elektrophorese jeweils 0,002 pmol (dieser Wert wurde in einer Diplomarbeit, die von Frau Gabriela Rebmann im Labor von Herrn Prof. Dr. Billeter angefertigt wurde, als optimal bestimmt) jeder für jeweils ein Gen spezifischen Standard-RNA gemischt. Diese besitzen mRNA Orientierung und hybridisieren entsprechend mit den anti-mRNA-orientierten, markierten Transkripten jeweils in der Länge des cDNA-Klones.

3. 12. Northern Blot Hybridisierung

Die Hybridisierung der Northern Blots erfolgt nach einer Standardmethode (Baczko et al., 1984, 1986) mit den unter (2. 8. 2.) beschriebenen ³²P-markierten strangspezifischen RNA-Proben komplementär zur mRNA der MV-Strukturgene (Cattaneo et al., 1986, 1987).

Die 3 cm breiten Nitrozellulosestreifen, auf die jeweils entweder 10 μ g +pA-RNA oder 30 μ g gesamte RNA transferiert sind, werden in 3 mm breite Streifen geschnitten. Diese werden in 10 cm lange silikonisierte Glasröhrchen mit 4 mm Durchmesser überführt. In jedes Röhrchen werden nun 2,5 ml Hybridisierungspuffer (50% deionisiertes Formamid, 50 mM KH₂PO₄ pH 7, 800 mM NaCl, 1 mM EDTA, 2,5 x Denhardts-

Lösung (50 x Denhardts = 2g Ficoll, 2g Polyvinylpyrrolidin, 2g BSA auf 200 ml H₂O), 20 ug/ml carrier DNA, 20 ug/ul carrier RNA), die 5 x 10⁶ cpm/ml Hybridisierungslösung jeweils eines ³²P-markierten RNA-Transkriptes enthalten, pipettiert. Eine Vorhybridisierung hat sich als nicht nötig erwiesen. Die Glasröhrchen werden mit Parafilm verschlossen und in ein 65° warmes Wasserbad überführt. Die Hybridisierungstemperatur von 55° wird eingestellt. Die Hybridisierung erfolgt über Nacht im geschlossenen Wasserbad.

Nach der Hybridisierung werden die Nitrozellulosestreifen bei Raumtemperatur einzeln in 15 ml Glasröhrchen überführt, die den Waschpuffer (0,1 x SSC, 0,1% SDS) enthalten. Der Puffer wird 2 x bei Raumtemperatur gewechselt, um den Großteil der radioaktiven Hybridisierungslösung zu entfernen. Der stringente Waschschritt wird anschließend unternommen. Hierfür werden die Streifen 3 x für 20 Min. bei 72° in 0,1 x SSC 0,1% SDS gewaschen. Das Nachwaschen erfolgt im gleichen Puffer für 60 Min. bei 37°. Da die M-spezifische Probe mit zellulären Sequenzen kreuzhybridisiert (G. Rebmann, Diplomarbeit), müssen bei Hybridisierungen mit nicht +pA-selektierter RNA die mit der M-spezifischen Probe hybridisierten Streifen stringenter (3 x 20 Min. bei 80° in 0,1 x SSC 0,1% SDS) gewaschen werden. Nach der Waschprozedur werden die noch feuchten Streifen der Genordnung folgend (Abb. 1a) nebeneinander auf 3MM-Papier montiert und anschließend bei Raumtemperatur autoradiographiert.

3. 13. Autoradiographie und Szintillationszählung

Die Autoradiographie der Northern Blots erfolgt bei Raumtemperatur und meist ohne Verstärkerfolie. Für die Quantifizierung der Hybridisierungssignale der einzelnen Strukturgene werden nach der Autoradiographie durch Auflegen des entsprechenden Röntgenfilms die Positionen der MV-spezifischen Signale auf den Nitrozellulosestreifen markiert. Die markierten Bereiche werden ausgeschnitten und trocken im Szintillationszähler gezählt. Zur Bestimmung des Hintergrunds werden für jeden Hybridisierungstreifen jeweils zwei Regionen ausgeschnitten und gezählt, die keine MV-spezifischen Signale enthalten.

3. 14. Nuklease S1-Kartierung

Bei den sogenannten RNA-Protektionsversuchen oder Nuklease-Kartierungen wird ein Gemisch von RNA mit einer radioaktiv markierten M13-Probe in einem kleinen Volumen hybridisiert (Favaloro et al., 1980, Berk und Sharp, 1979, Brown et al., 1982, Davis et al., 1986). Danach werden alle einzelsträngigen Nukleinsäuren, also die, die nicht hybridisieren konnten, mittels einer Nuklease (S1 oder Mung Bean Nuklease) verdaut. Nach der Reaktion trennt man die vor dem Verdau geschützten Nukleinsäurefragmente in einem 8% Polyacrylamidgel mit 7% Harnstoff auf (siehe Primer Extension). Das Prinzip der Methode ist in Abb. 7 G - I dargestellt.

Für die Hybridisierung zellulärer RNA werden 1×10^6 cpm in einer "Primer-Extension"-Reaktion markierter M13-ssDNA verwendet.

Vor der Hybridisierung werden 10 - 20 μ g RNA zusammen mit 1×10^6 cpm M13-ssDNA zunächst für 10 Min. eingefroren und danach für 30 Min. lyophilisiert. Die Komponenten werden anschließend in 10 μ l Hybridisierungspuffer aufgenommen (0,4 M NaCl, 40 mM Hepes pH 6,4, 1 mM EDTA, 80% deionisiertes Formamid), darin für 20 Min. bei 60° denaturiert und für 4 bis 16 Stunden bei 42° in den Eppendorfgläsern hybridisiert.

Die Reaktion wird auf Eis beendet: Die Proben werden aus dem Hybridisierungswasserbad entnommen und mit je 100 μ l eiskaltem Nuklease S1-Puffer (250 mM NaCl, 30 mM NaOAc pH 4,5, 1 mM ZnSO₄) versehen.

Diese Mischung wird in ein 30° warmes Wasserbad überführt. Jeder Probe werden 70 U Nuklease S1 zugegeben und der Verdau für 1 Stunde durchgeführt. Der Verdau wird durch die Extraktion mit einer Phenol/Chloroform-Mischung (1 : 1) beendet. Die wässrige Phase wird in ein neues Eppendorfröhrchen überführt und zusammen mit 20 μ g carrier RNA in Ethanol ausgefällt. Nach der Zentrifugation (30 Min. im Kaltraum bei 12000 rpm in der Eppendorfsentrifuge) wird das Sediment im Vakuum getrocknet und in 10 μ l Probenpuffer (0,5% Bromphenolblau, 0,5% Xylencyanol, 0,01 mM EDTA, 90% Formamid) aufgenommen. Die Proben werden für 2 Min. bei 100° denaturiert, auf Eis abgekühlt und auf ein vorgewärmtes denaturierendes Polyacrylamidgel aufgetragen (siehe 3. 10. 3.). Die Elektrophorese erfolgt für ca. 2 Stunden bei 40 Watt. Anschließend wird das Gel über Nacht autoradiographiert.

3. 15. In situ Hybridisierung

Die Methode erlaubt die Charakterisierung virusspezifischer RNAs in intakten Zellen oder Geweben. Für die Hybridisierung werden die beschriebenen MV-Gem1-Klone mit ^{35}S -rUTP markiert und auf Cryostat- bzw. Paraffinpräparate von Rattengehirnen appliziert. Im Wesentlichen wurde die Methode nach dem Protokoll von Haase et al., 1984 durchgeführt.

In Abb. 9 sind zur Darstellung der Methode zwei Kontrollhybridisierungen an Gehirnschnitten akut erkrankter Lewis-Ratten dargestellt, die mit MV-spezifischen (a) und nur vektorspezifischen (b) Proben hybridisiert ist.

3. 15. 1. Vorbereitung der Objektträger

Objektträger müssen geeignet beschichtet werden, um eine unspezifische Bindung der markierten Probe an die Glasoberfläche zu verhindern und die Adhäsion der Gewebe- oder Zellpräparate an den Objektträger zu unterstützen. Hierfür werden die Objektträger zunächst für 20 Min. in 1 M HCl, anschließend mit dest. H_2O gewaschen und in Ethanol dehydriert. Nach dem Trocknen werden die bei 60° über Nacht in 1 x Denhardts-Lösung (50 x Denhardts-Lösung = 2g Ficoll, 2g Polyvinylpyrrolidin, 2g BSA pro 200 ml 3 x SSC) inkubiert und danach für 20 Min. in Ethanol:Eisessig (3 : 1) fixiert (Haase et al., 1984). Danach werden die Objektträger durch Schütteln für 10 Min. in 0,25% Acetanhydrid-Lösung in 0,1 M Triethanolamin acetyliert (Hayashi et al., 1978). Die so beschichteten Objektträger werden über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und bei Raumtemperatur aufbewahrt.

Für Paraffinpräparate werden die Objektträger zur optimalen Bindung der Schnitte silanisiert (Maples, 1985, Tourtellotte et al., 1987). Hierfür werden sie über Nacht in einer 1%igen Organosilan-Lösung (gamma-amino-propyl-Triethoxysilan) pH 3, 45 bei 70° inkubiert, anschließend in dest. H_2O gewaschen und über Nacht bei 100° gebacken. In dieser Form können sie bis zu 6 Monaten bei Raumtemperatur in staubfreien Gefäßen aufbewahrt werden.

Die Aktivierung der Objektträger erfolgt unmittelbar vor ihrer Beschickung mit den Gewebe- oder Zellpräparaten durch die Inkubation in einer 10%igen Glutardialdehyd-Lösung in PBS pH 7 für 30 Min. bei Raumtemperatur.

Anschließend werden die Objektträger kurz in H₂O gewaschen. Die Aktivierung wird durch eine 0,1 M Natrium-meta-Periodat-Lösung (15 Min. bei Raumtemperatur) stabilisiert. So aktivierte Objektträger sind für etwa 8 Wochen in staubfreien Gefäßen bei Raumtemperatur stabil.

3. 15. 2. Vorbehandlung und Fixierung der Präparate

3. 15. 2. 1. Gewebekulturzellen

Zellen, die in Monolayer-Kulturen wachsen (z. B. Verozellen) werden direkt auf vorbehandelte (siehe oben), autoklavierte Objektträger in großen Glaspetrischalen ausgesät und bis zur Konfluenz hochgezogen.

Nichtadhärente Zellen wie z. B. Lymphozyten, werden mit einer Zelldichte von 3×10^5 Zellen/ml durch Zentrifugation in einer Zytocentrifuge bei 500 rpm für 5 Min. auf vorbehandelte Objektträger aufzentrifugiert.

Die Zellen werden bei Raumtemperatur für 1 Stunde getrocknet und anschließend in Ethanol:Eisessig (3 : 1) für 20 Min. fixiert. Nach der Fixierung werden die Zellpräparate für 10 Min. in Ethanol gewaschen und 20 Min. getrocknet.

3. 15. 2. 2. Gehirnmateriale

3. 15. 2. 2. 1. Cryostatschnitte

Für Gefrierschnitte werden die frisch entnommenen Rattengehirne für 60 sec. in auf -150° (in flüssigem Stickstoff) vorgekühltem Isopentan eingefroren und anschließend bei -70° aufbewahrt. Am Gefriermikrotom werden bei -25° 6 - 8 um dicke Serienschnitte angefertigt, die auf die vorbehandelten Objektträger überführt werden. Die Schnitte werden für mindestens eine Stunde getrocknet, danach für 20 Min. in -20° kaltem Azeton fixiert und wiederum für eine Stunde bei Raumtemperatur getrocknet. Die Aufbewahrung der Cryostatschnitte erfolgt bei -20° in Gegenwart von Silikagel.

3. 15. 2. 2. Paraffinschnitte

Frisch entnommene Rattengehirne werden für 96 Stunden bei 4° in einer 4%igen Paraformaldehyd-Lösung (pH 7,4 in 0,1 M PBS) fixiert. Danach wird das Gewebe in Paraffin eingebettet. Am Mikrotom werden 5 µm dicke Serienschnitte angefertigt, die nach dem Schneiden auf den vorbehandelten Objektträgern eine Stunde bei 37° getrocknet werden.

Vor der Hybridisierung muß das Paraffin wieder aus den Präparaten entfernt werden. Dies geschieht standardmäßig durch Backen für 2 Stunden bei 55° und anschließender Lösung des Paraffins 2 x für 10 Min. in Xylol. Anschließend werden die Präparate 10 Min. in einer aufsteigenden Alkoholreihe rehydriert.

3. 15. 3. Vorbehandlung der Präparate zur Verbesserung der Diffusion der Proben

Um die Diffusion der Proben in das Gewebe oder die Zellen bei der Hybridisierung zu erleichtern, werden die Präparate geeignet vorbehandelt, um Proteine zu entfernen und die Nukleinsäuren im Zellinneren freier zugänglich zu machen.

Hierfür werden die Präparate zunächst für 20 Min. bei Raumtemperatur in 0,2 N HCl gewaschen und anschließend in dest. H₂O gespült. Danach erfolgt eine Inkubation in 2 x SSC für 30 Min. bei 70°, eine kurze Spülung in dest. H₂O und anschließend ein Verdau mit Proteinase K (1 µg/ml in 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM CaCl₂) bei 37° im Wasserbad. Der Verdau wird durch zweimaliges Spülen in dest. H₂O beendet. Anschließend werden die Präparate über eine aufsteigende Alkoholreihe dehydriert und vor der Hybridisierung für mindestens eine Stunde getrocknet.

3. 15. 4. RNA-Hybridisierung

Die Hybridisierung wird in möglichst kleinem Hybridisierungsvolumen mit möglichst optimaler Konzentration der jeweiligen Proben vorgenommen. Diese beträgt in den durchgeführten Experimenten 2 x 10⁵ cpm markierter Probe pro 25 µl Hybridisierungsvolumen pro Objektträger.

Die Probe wird zunächst zusammen mit je 10 µg carrier tRNA für 30 Min. lyophilisiert und anschließend direkt im

Hybridisierungspuffer aufgenommen (50% Lösung A: 20% Dextransulfat in deionisiertem Formamid, 50% Lösung B: 20 mM Hepes pH 7,2, 1,2 M NaCl, 2 mM EDTA, 0,04% Ficoll, 0,04% Polyvinylpyrrolidin, 0,04% BSA, 200 ug/ml gescherte Kalbsthymus-DNA, 100 ug/ml poly (A)-RNA). Die Probe wird in diesem Puffer durch Kochen für 3 Min. denaturiert und anschließend auf Eis abgekühlt. Nach dem Abkühlen wird zur Probe 1 M DTT zugegeben (Endkonzentration: 10 mM), um den Hintergrund der Hybridisierung zu verbessern.

25 ul dieser Hybridisierungslösung werden auf jeweils einen Objektträger gegeben und mit einem silikonisierten, autoklavierten Deckglas (50 x 25 mm) möglichst blasenfrei abgedeckt. Um die Evaporation der Hybridisierungslösung zu verhindern, werden die Kanten des Deckglases mit Fixogum verschlossen. Nach Aushärten des Klebstoffes werden die Objekte für 48 Stunden bei Raumtemperatur in einer feuchten Kammer im Dunkeln (Formamid ist lichtempfindlich) hybridisiert.

3. 15. 5. Waschen der Hybridisierung

Nach der Hybridisierung werden zunächst die Deckgläser vorsichtig von den Präparaten entfernt. Hierfür wird der Klebstoff mit einer Pinzette abgezogen und die Objektträger 2 x für 10 Min. in Hybridisierungs-Wasch-Medium (HWM: 50% Formamid, 0,6 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 2 mM EDTA) gewaschen. Dabei fallen die Deckgläser von selbst ab. Das stringente Waschen erfolgt nun zunächst bei 55 - 60° in 2 x SSC für eine Stunde, danach mit HWM entweder bei Raumtemperatur über Nacht oder für 30 Min. bei 55°. Der Erfolg der Waschung kann grob mit dem Monitor überprüft und die Waschdauer dementsprechend verlängert oder verkürzt werden. Anschließend wird das Formamid durch 10 minütiges Waschen in 2 x SSC abgespült. Über eine aufsteigende Alkoholreihe werden die Präparate dehydriert, bei Raumtemperatur getrocknet und bis zur Autoradiographie in staubfreien Gefäßen aufbewahrt.

3. 15. 6. Autoradiographie mit Röntgenfilmemulsion

Für die autoradiographische Darstellung der in situ hybridisierten Objekte wird NTB-2-Röntgenfilmemulsion von Kodak verwendet.

15 g Röntgenfilmemulsion werden in absoluter Dunkelheit in

20 ml 0,6 M Ammoniumacetat für 20 Min. bei 43° im Wasserbad geschmolzen. Die verdünnte Emulsion wird in eine Glasküvette umgefüllt, in welche die Objektträger vorsichtig eingetaucht werden. Diese werden anschließend für mindestens 60 Min. in einem speziellen Trockner (Oncor) luftgetrocknet und anschließend in Expositionsgefäßen in Gegenwart von Silikagel im Kühlschrank autoradiographiert.

Die Entwicklung der Autoradiographien erfolgt in Kodak D-19-Entwickler für 5 Min. bei Raumtemperatur, die Fixierung in 30% Natriumthiosulfat-Lösung für 10 Min. ebenfalls bei Raumtemperatur.

Die Präparate werden anschließend mit Hämatoxylin für 5 Min. gegengefärbt.

3. 16. Methoden zur Darstellung MV-spezifischer Protein-expression

3. 16. 1. In vivo-Markierung MV-spezifischer Proteine

Für die Präparation von markiertem Lysat aus infizierten Zellen werden die Zellen in Platten mit 5 cm Durchmesser ausgesät, über Nacht hochgezüchtet und anschließend mit einer MOI von 1 mit Virus infiziert. Nach der Ausbildung eines möglichst starken CPE wird das Kulturmedium mit dem Virus entfernt und die Zellen zweimal mit PBS gewaschen.

Die Zellen erhalten nun 1,5 ml PBS pro Platte, in dem 0,5 mCi ³⁵S-Methionin enthalten sind und werden 3 - 4 Stunden im Brutschrank bei 37° inkubiert. Die Inkubation sollte nicht wesentlich länger erfolgen, da die Zellen nun kein Kulturmedium mehr haben und somit nicht mehr lange überlebensfähig bleiben.

Die Aufarbeitung des Zell-Lysats erfolgt anschließend bei 4° im Kaltraum, alle verwendeten Lösungen und Geräte (einschließlich des Rotors und der Ultrazentrifuge) sind auf diese Temperatur vorgekühlt.

Der radioaktive Überstand wird entfernt, die Zellen werden zweimal mit je 1 ml RIPA-Lösung (0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4, 1/20 Vol. Aprotinin, 1 mM PMSF) (Lamb et al., 1978) pro Platte gewaschen, ohne den Zellrasen zu zerstören.

Anschließend werden die Zellen mit je 1 ml RIPA-Lösung pro Platte abgeschabt und in ein SW 55-Zentrifugenröhrchen überführt. Die Platte wird mit 0,5 ml RIPA-Lösung nachgewaschen. Die in dem RIPA-Puffer befindlichen Zellen werden nun durch die Zugabe von 0,1 Vol 10 x RIPA-Detergenz (1 x RIPA-Detergenz = 0,15 M NaCl, 10 mM Tris-HCl pH 7,4 1%

DOC, 1% Triton X 100, 0,1% SDS, 1/20 Vol. Aprotinin, 1 mM PMSF) und 20 sec. Vortexen lysiert.

Das Lysat wird anschließend in der Ultrazentrifuge für 20 Min. bei 25 000 rpm und 4° abzentrifugiert. Der Überstand enthält die nun markierten Proteine. Das Zell-Lysat wird in 500 ul-Portionen aliquotiert und bei -20° bis zur Weiterverwendung in der Immunpräzipitation (siehe 3. 16.3.) aufbewahrt

3. 16. 2. In vitro Synthese MV-spezifischer Proteine

In vitro werden MV-spezifische Proteine in einem zellfreien in vitro Translationssystem (einem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat) unter Zugabe der isolierten +pA-Fraktionen (3. 4. 4.) und ³⁵S-Methionin als markierte Proteine dargestellt.

Für die Reaktion werden jeweils 10 ul N 90-Retikulozyten-Lysat, 25 uCi ³⁵S-Methionin und 1 ug +pA-RNA (in 1ul H₂O und vorher für 1 Min. bei 100° denaturiert) im Eisbad möglichst blasenfrei zusammenpipettiert und für eine Stunde bei 30° im Wasserbad inkubiert.

Nach Abschluß der Reaktion wird dem Reaktionsgemisch 1 ul für die Bestimmung des Einbaus der Radioaktivität durch Fällung mit TCA (Trichloressigsäure) entnommen.

Für die TCA-Fällung wird der 1 ul radioaktiver Lösung in 1 ml 0,1 mg/ml BSA, 0,5 ml Methionin (4 mg/ml in 1 N NaOH) gegeben und bei 37° für 15 Min. im Wasserbad inkubiert. Anschließend werden die Proteine durch die Zugabe von 3 ml 10% TCA für 10 Min. bei Raumtemperatur gefällt und über eine Glasfritte auf Whatman-Filter im Vakuum filtriert. Die Filter werden jeweils zweimal mit 10% TCA und zweimal mit Ethanol nachgewaschen und getrocknet.

Nach der Zugabe von Szintillationsflüssigkeit werden die Filter im Szintillationszähler gezählt.

3. 16. 3. Immunpräzipitation in vivo oder in vitro synthetisierter MV-spezifischer Proteine

Die in vitro oder in vivo markierten MV-spezifischen Proteine können zur Darstellung vorhandener Antikörper in Serum- und Liquorproben von infizierten Versuchstieren verwendet werden (Rima et al., 1987).

Hierfür werden 50 ul markiertes Zell-Lysat oder auf 50 ul in Machamer-Puffer (15 Triton X 100, 0,15 M NaCl, 5 mM EDTA, 50 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 M PMSF) (Machamer et al., 1980) verdünntes in vitro Translationsreaktionsgemisch zusammen

mit 2ul Serum- oder Liquor mindestens für 2 Stunden (besser über Nacht) im Kühlschrank bei 4° inkubiert.

Nach der Inkubation werden die Immunkomplexe an Protein A-Partikel adsorbiert: 50 mg Protein-A-Sepharose werden in 6 ml RIPA- oder Machamer-Puffer 40 Min. bei Raumtemperatur vorgequollen, bei 1000 rpm abzentrifugiert, zweimal mit dem entsprechenden Puffer gewaschen und 1:1 in Puffer verdünnt. 10 ul dieser vorgequollenen Protein-A-Sepharose werden zu dem Immunpräzipitationsansatz gegeben und bei Raumtemperatur unter gelegentlichem Schütteln adsorbiert.

Anschließend wird das Gemisch viermal mit etwa 500 ul RIPA bzw. Machamer-Puffer gewaschen, der Überstand wird so weit als möglich abgesaugt (möglichst bis auf 25 ul Restvolumen), 1 : 1 mit 2 x Proteingelprobenpuffer aufgenommen und in diesem Puffer für 2 Min. im Wasserbad durch Kochen denaturiert. Bis zur Auftrennung über ein SDS-haltiges Polyacrylamidgel werden die Proben im Kühlschrank verwahrt.

3. 16. 4. Proteingelelektrophorese

Für die Auftrennung von Proteinen werden SDS-haltige diskontinuierliche Polyacrylamidgele (Lämmli, 1970) verwendet.

Zunächst wird das Trenngel gegossen. Hierfür werden folgende Komponenten je nach gewünschtem Auftrennungsbereich zusammengemischt

	10%	12%	14%	
Acrylamid/Bisacrylamid (30 g + 0,39 g ad 100 ml)	11,7	14,0	16,3	ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,7	8,8	8,8	8,8	ml
H ₂ O	13,9	11,6	9,3	ml
20% SDS	175	175	175	ul
10% APS	100	100	100	ul
TEMED	10	10	10	ul

für Gele von Immunpräzipitationen aus in vitro Translationsprodukten und gesamten Translationsprodukten und

	8%	10%	12%	
Acrylamid/Bisacrylamid (40 g + 1,3 g)	6,4	8	9,6	ml
1,5 M Tris-HCl pH 8,7	8	8	8	ml
H ₂ O	17,2	15,6	14	ml
20% SDS	160	160	160	ul
10% APS	280	280	280	ul
TEMED	10	10	10	ul

für Trenngele zur Auftrennung von Immunpräzipitationen mit in vivo markierten Proteinen.

Das Sammelgel ist für beide Präparationen gleich (4%)

Acrylamid/Bisacrylamid (7,5 g + 0,325 g)	1,3	ml
1 M Tris-HCl pH 6,8	1,25	ml
H ₂ O	6	ml
20% SDS	50	ul
10% APS	50	ul
TEMED	5	ul

Nach der Polymerisation des Gels werden die denaturierten Proben aufgetragen. Die Elektrophorese wird unter Kühlung des Gels in 1 x Proteingepuffer (144 g Glycin, 30,3 g Tris, 10 g SDS/l) bei 40 - 45 mA durchgeführt.

Nach dem Lauf werden die aufgetrennten Proteine in 30% Methanol 10% Eisessig über Nacht fixiert. Vor der Autoradiographie werden die Signale durch Waschen des Gels in Amplify (2 x 15 Min. bei Raumtemperatur) verstärkt und das Gel anschließend auf dem Geltrockner bei 80° für 2 Stunden getrocknet.

4. Ergebnisse

4. 1. Untersuchungen zur Spezifität der verwendeten MV-spezifischen cDNA-Klone und Sensitivität der Hybridisierungsmethoden

4. 1. 1. Hybridisierung der Masernvirus-spezifischen cDNA-Proben mit zellulären Sequenzen

Für den Nachweis der Spezifität der für alle folgenden Hybridisierungsexperimente verwendeten MV-spezifischen RNA-Proben (abgebildet unter 2. 8. 2.) wurden diese in Northern Blot Analysen mit Kontroll-RNAs aus nicht infizierten Verozellen und dem Gehirn nicht infizierter Lewis- und BN-Ratten hybridisiert und auf mögliche Kreuzhybridisierungen mit endogenen zellulären Sequenzen untersucht. Zur Kontrolle der erfolgreich durchgeführten Hybridisierungsreaktion wurden unter die extrahierten RNA-Präparationen jeweils 2 fmol der in vitro synthetisierten Standard-RNAs für jedes einzelne MV-Strukturgen (N, P, M, F und H) gemischt, die in Gegenstrang-Orientierung zu den verwendeten ^{32}P -markierten RNA-Proben (also in mRNA-Orientierung) transkribiert und auf eine definierte Konzentration von 0,01 pmol eingestellt waren (siehe Methodenteil unter 3. 11.).

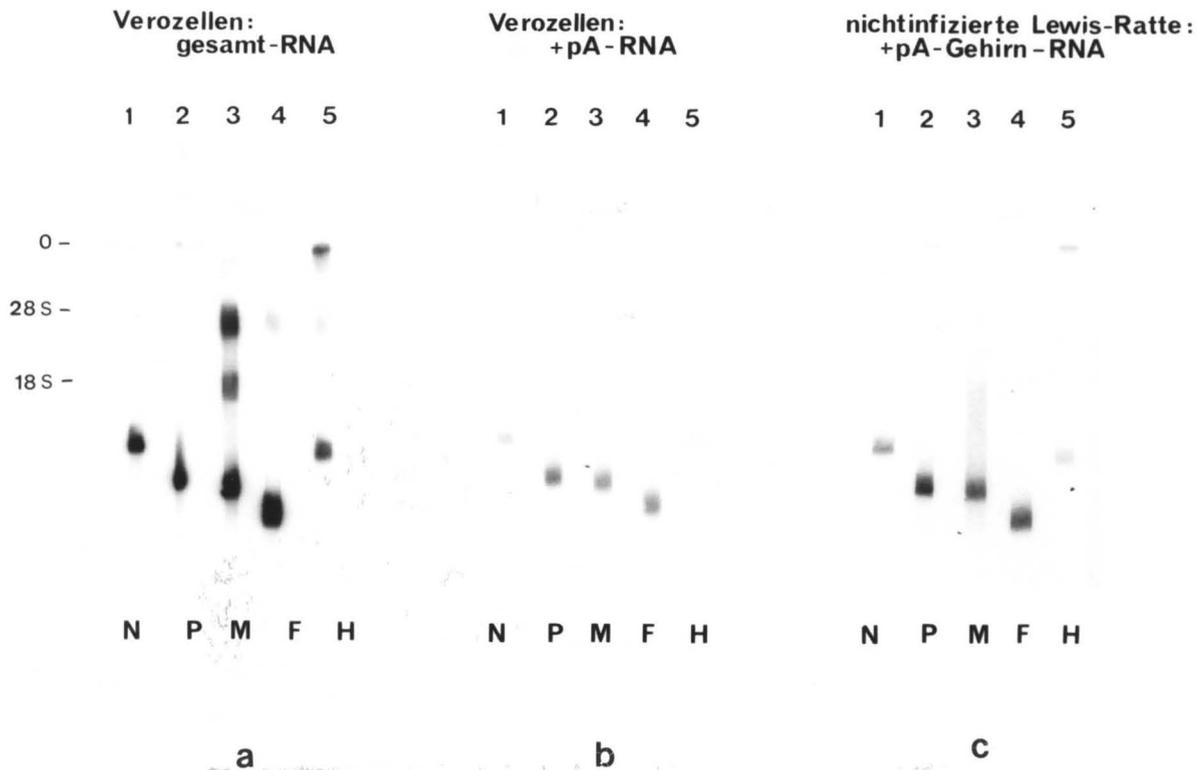
Auf die Analyse der Expression der mRNA des L-Gens wurde in dieser und in allen folgenden Untersuchungen verzichtet, da die Konzentration der L-spezifischen mRNA bereits in der lytischen Infektion von Gewebekulturzellen sehr gering war

und sich quantitativ nur sehr bedingt analysieren ließ. Da zudem das Gen für die L-mRNA noch nicht kloniert und sequenziert ist, konnte auch die qualitative Expression der mRNA im Northern Blot Experiment nicht getestet werden. Für die Kontroll-Hybridisierungen wurde gesamte, nicht selektierte RNA und +pA-selektierte RNA verwendet. Die Autoradiogramme der Kontroll-Northern Blots sind in Abb. 10 für die gesamte RNA (Abb. 10a) und die +pA-selektierte RNA aus nicht infizierten Verozellen (Abb. 10b), sowie die +pA-selektierte RNA aus dem Gehirn einer nicht infizierten Lewis-Ratte (Abb. 10c) dargestellt.

Die Northern Blot Analyse der gesamtzellulären RNA (Abb. 10a) zeigt, daß alle verwendeten Proben mehr oder weniger stark mit zellulären Sequenzen kreuzhybridisierten, die im Bereich der 28 S-ribosomalen RNA liegen. Besonders stark ausgeprägt ist dies für die M-spezifische Probe, die außerdem zusätzlich ein Signal im Bereich der 18 S-ribosomalen RNA ergibt. Dieser Effekt ist vermutlich sequenzbedingt, da diese cDNA-Probe aus einem Bereich des M-Gens kloniert wurde, der sehr lange GC-reiche Regionen besitzt. Nach der +pA-Selektion derselben RNA-Präparation sind in der Northern Blot Analyse nur noch schwache, für die M-Probe spezifische Kreuzhybridisierungen im Bereich der zellulären ribosomalen RNAs zu erkennen (Abb. 10b), für die anderen Proben waren auch nach langen Expositionszeiten keine Signale für zelluläre Sequenzen mehr nachweisbar.

Abb. 10

Spezifität der MV-pGem1-Klone



Die gesamte RNA (a) und die +pA-selektierte RNA aus nicht infizierten Verzellen (b) und +pA-selektierte RNA aus dem Gehirn einer nicht infizierten, vier Wochen alten Lewis-Ratte wurden zusammen mit jeweils 2 fmol des Standard-RNA-Gemisches (siehe Methoden) über ein 1,5% iges, formaldehydhaltiges Agarosegel aufgetrennt, auf Nitrozellulose transferiert und mit den jeweils für ein MV-Strukturgen spezifischen, ^{32}P -markierten einzelsträngigen RNA-Proben hybridisiert.

Die Hybridisierungstreifen wurden der Genordnung folgend montiert (Spur 1 - 5: N, P, M, F und H) und für 12 Stunden autoradiographiert. Die Positionen der 28 S und 18 S ribosomalen RNA und die Auftragsstellen der RNAs im Gel sind markiert. Die niedermolekularen Banden, die in allen drei Autoradiogrammen erscheinen, sind Ergebnis der Hybridisierung der verwendeten Proben mit den untergemischten Standard-RNAs

Die Hybridisierung der RNA-Proben mit aus dem Gehirn einer vier Wochen alten, nicht infizierten Lewis-Ratte extrahierter +pA-selektierter RNA ist in Abb. 10c dargestellt. Hier finden sich keine Kreuzhybridisierungen der Proben mit zellulären Sequenzen. Ein ähnliches Bild zeigte die Hybridisierung mit der RNA aus dem Gehirn einer nicht infizierten BN-Ratte gleichen Alters.

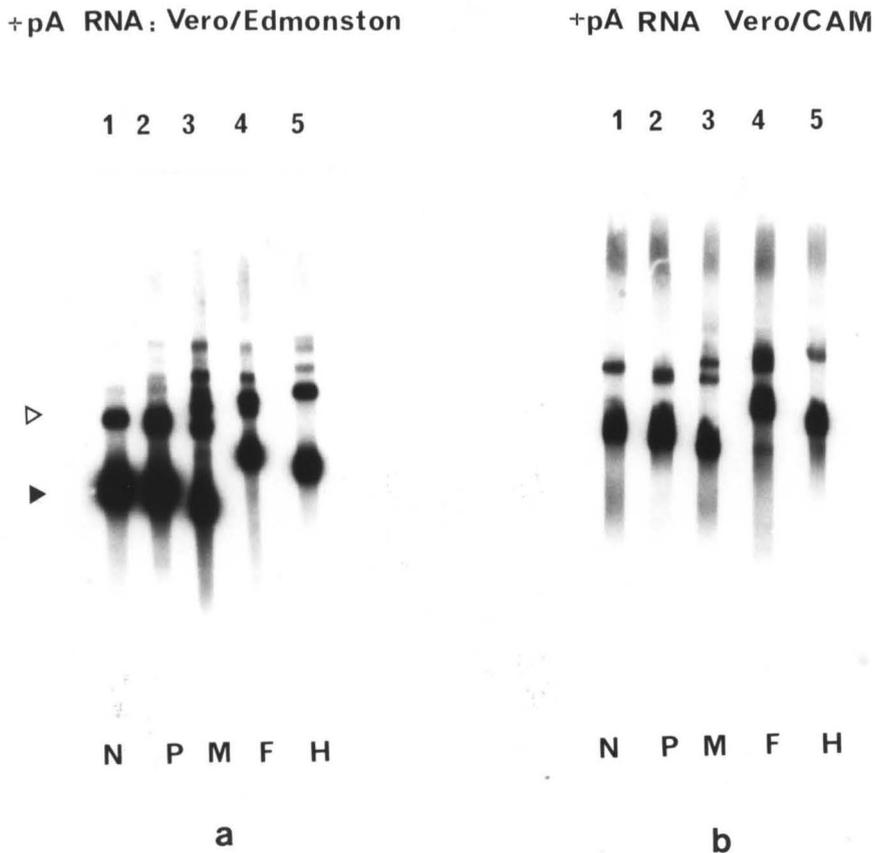
4. 1. 2. Charakterisierung MV-spezifischer Genexpression in lytisch infizierten Gewebekulturen

Vor den Untersuchungen zur Genexpression des MV in Rattenhirnen wurde zunächst die MV-Expression in lytisch infizierter Gewebekultur charakterisiert und die Spezifität der verwendeten cDNA-Proben für die einzelnen MV-Strukturgene in Northern Blot Hybridisierungen gezeigt. Aus Verozellkulturen, die entweder mit dem Edmonston- oder mit dem CAM-Virus infiziert worden waren, wurde die gesamte RNA extrahiert und anschließend +pA-selektioniert.

Wie das in Abb. 11 dargestellte Autoradiogramm der Northern Blot Analyse der beiden isolierten +pA/RNAs zeigt, finden sich spezifische Signale der monocistronischen mRNAs der untersuchten viralen Strukturgene der mRNAs: N, P, M, F und H (jeweils in den Spuren 1 - 5). Die unterschiedlichen Laufstrecken der einzelnen mRNAs reflektieren die unterschiedliche Größe der viralen Transkripte (siehe Abb. 1), die, dem einleitend unter 1. 3. 1. beschriebenen Expressionsgradienten

Abb. 11

Northern Blot Analyse der +pA-RNA aus lytisch mit MV infizierten Verozellen



Die RNA aus Verozellen, die entweder mit Edmonston-Virus (a) oder CAM-Virus (b) lytisch infiziert waren, wurde extrahiert, +pA-selektiert und der Größe nach auf einem formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennt. Nach dem Transfer auf Nitrozellulose wurden einzelne Streifen hergestellt und mit ^{32}P -CTP-markierten jeweils für ein Gen spezifischen einzelsträngigen mRNA-spezifischen RNA-Proben hybridisiert. Die Streifen wurden der Genordnung folgend montiert und 30 min. autoradiographiert. Die Blots zeigen die monocistronischen mRNAs (▶) als jeweils stärkste Signale für jedes Strukturgen: N (Spur 1) - P (Spur 2) - M (Spur 3) - F (Spur 4) - H (Spur 5). Die Hybridisierungssignale werden von N nach H schwächer. Dies entspricht dem Expressionsgradienten der MV-Transkripte. Die höhermolekularen Signale (▷) sind Ergebnis der Hybridisierung der Proben mit viralen bi- und tricistronischen +pA-RNAs.

geringere Kopienzahl eingestellt wurden. Diese Misch-RNAs

folgend, vom N-Gen zum H-Gen in ihrer Expressionsintensität abnehmen. Die polycistronischen Transkripte sind als höhermolekulare Banden in den einzelnen Spuren oberhalb der mRNA-spezifischen Signale zu sehen. Genomische RNA konnte durch Hybridisierung der isolierten +pA-Fractionen nicht darstellgestellt werden. Diese Hybridisierungsexperimente bestätigten die Spezifität der verwendeten MV-spezifischen cDNA-Klone in ihrer Erkennung viraler Sequenzen.

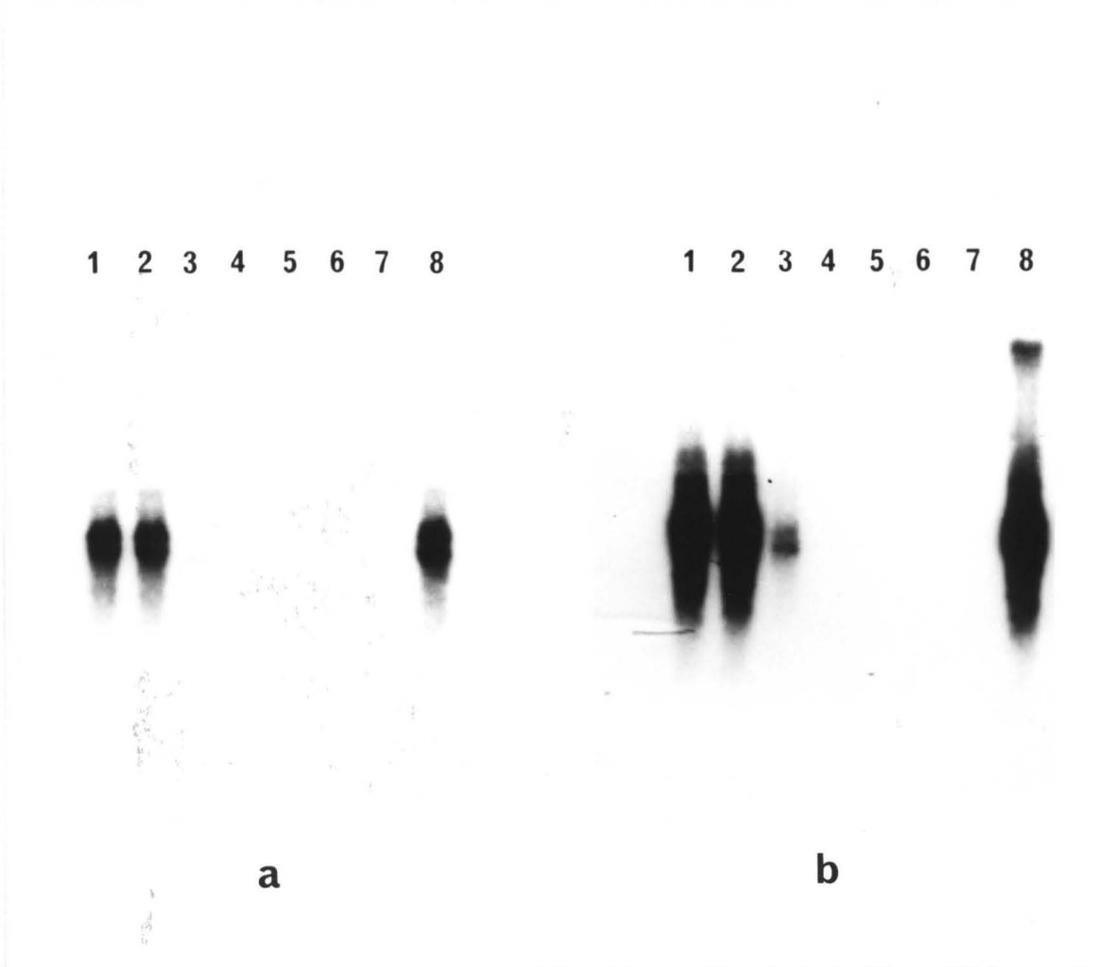
4. 1. 3. Untersuchungen über die Nachweisgrenzen der verwendeten Hybridisierungsmethoden

Zur Bestimmung der Nachweisgrenzen für MV-spezifische Transkripte unter den angewandten experimentellen Bedingungen, wurden Sensitivitätsuntersuchungen sowohl für die Northern-Blot Hybridisierungen mit ^{32}P -markierten RNA-Proben als auch für die Nuklease S1-Kartierungs-Experimente mit einzelsträngigen ^{32}P -markierten M13-DNA-Proben durchgeführt. Für beide Versuchsansätze wurde jeweils eine definierte Menge eines nicht markierten, in vitro synthetisierten N-Gen-spezifischen Transkripts, welches mRNA-Orientierung besaß, unter aus nicht infizierten Zellen extrahierte RNA gemischt. Unter Berücksichtigung des durchschnittlichen RNA-Gehalts einer Verozelle (10 pg gesamte RNA) und der berechneten Masse einer Kopie der in vitro synthetisierten RNA ließen sich definierte Misch-RNAs herstellen, die auf 5 Kopien des Trankripts pro Zelle oder eine geringere Kopienzahl eingestellt wurden. Diese Misch-RNAs

wurden entweder im Northern Blot mit dem ^{32}P -markierten Gegenstrang-Transkript (pSP64MV3S-Transkript, (2.8.1.) Abb. 12) oder im Nuklease S1-Kartierungsexperiment mit der gegensträngig orientierten, ^{32}P -markierten M13-DNA-Probe (mp 9/32, (2.8.1.) Abb. 13) hybridisiert.

Unter diesen Bedingungen lag die Nachweisgrenze in der Northern Blot Analyse für ein deutliches MV-spezifisches Signal bei einer Kopie des synthetischen Transkripts pro Zelle (Abb. 12). Die Sensitivität der Nuklease S1-Kartierung war mindestens zehnfach höher, da sich für die 0,1 Kopie pro Zelle enthaltende Misch-RNA noch ein deutliches Signal ergab (Abb. 13, Spur 7). Bei starker Überexposition des Gels (diese ist hier nicht dokumentiert) war auch in der Folgespur (Abb. 13, Spur 8) noch ein schwaches Hybridisierungssignal an der erwarteten Position erkennbar, dessen Identifikation unter weniger definierten Bedingungen jedoch nicht eindeutig wäre. Die Nachweisgrenze dieser Methode wurde aufgrund dieser Experimente mit etwa 0,1 - 0,05 Kopien des Transkripts pro Zelle bestimmt.

Abb. 12
Sensitivitätsbestimmung der Northern Blots mit
strangspezifischen RNA-Proben

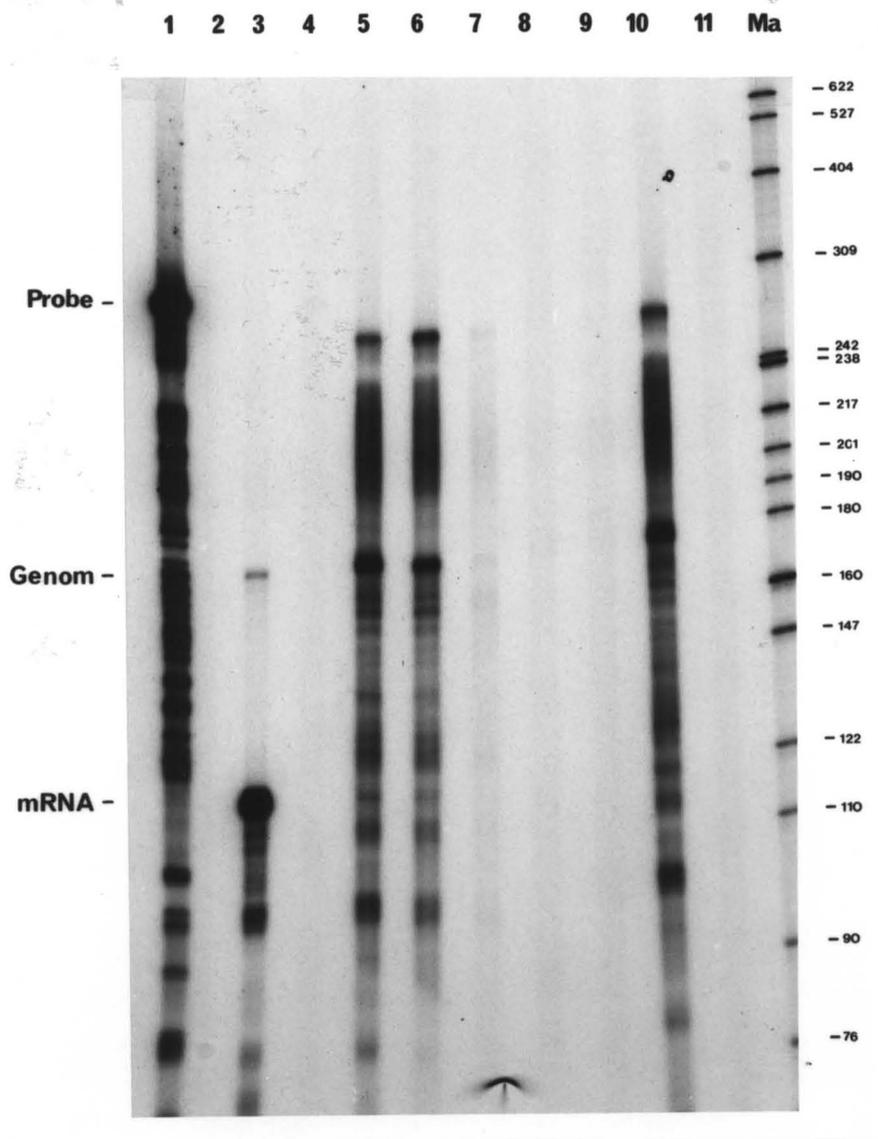
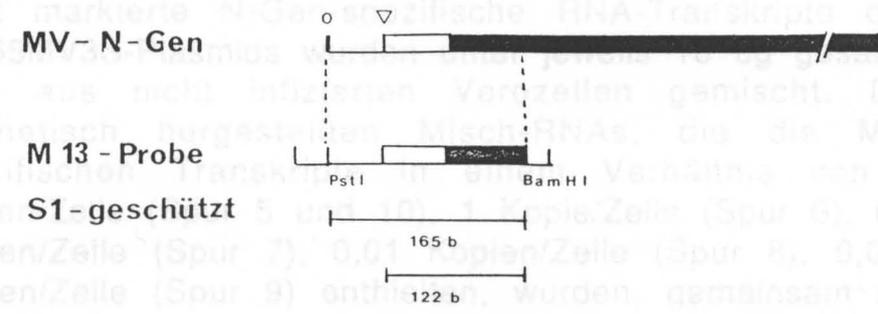


In vitro synthetisierte, nicht markierte N-mRNA-orientierte RNA-Transkripte des pSp65MV3S-Plasmids (2. 8. 1.) wurden unter jeweils 10 µg gesamt-RNA aus nicht infizierten Verozellen gemischt, sodaß sich die in den Spuren 1 - 8 auf eine 1,5%igen formaldehydhaltigen Agarosegel aufgetrennten definierten Misch-RNAs ergaben: Spur 1, 2 und 8: 5 Kopien MV-Transkript/Zelle, Spur 3: 1 Kopie pro Zelle, Spur 4: 0,1 Kopie pro Zelle, Spur 5: 0,01 Kopie pro Zelle, Spur 6: 0,001 Kopie pro Zelle und Spur 7: 0,0001 Kopie pro Zelle.

Das Gel wurde auf Nitrozellulose transferiert und mit dem gegensträngig orientierten ³²P-markierten pSp64MV3S-Transkript hybridisiert. Abb. 12b stellt eine längere Expositionsdauer (24 Stunden) desselben Blot dar, der in Abb. 12a gezeigt ist (6 Stunden).

markierte ssDNA komplementär zur mRNA und dem

Abb. 13
Sensitivität der Nuklease S1-Kartierung



Das 230 Basen lange Pst I/Bam HI-Fragment vom 3' -Ende des MV-Genoms wurde in M13 mp 9 kloniert (mp9/32 siehe 2. 8. 1.). Mit Hilfe eines 15 Basen langen Sequenzierprimers und Klenow-Polymerase wurde die ³²P-markierte ssDNA komplementär zur mRNA und dem

Positiv-Strang-Genom synthetisiert. In vitro hergestellte, nicht markierte N-Gen-spezifische RNA-Transkripte des pSp65MV3S-Plasmids wurden unter jeweils 10 µg gesamt-RNA aus nicht infizierten Verozellen gemischt. Die synthetisch hergestellten Misch-RNAs, die die MV-spezifischen Transkripte in einem Verhältnis von 5 Kopien/Zelle (Spur 5 und 10), 1 Kopie/Zelle (Spur 6), 0,1 Kopien/Zelle (Spur 7), 0,01 Kopien/Zelle (Spur 8), 0,001 Kopien/Zelle (Spur 9) enthielten, wurden, gemeinsam mit Kontroll-RNAs (Spur 3: aus lytisch infizierten Verozellen, Spur 4 und 11: nicht infizierte Verozellen) mit der Probe hybridisiert. Anschließend wurde ein S1-Verdau durchgeführt. Oberhalb der Abb. sind die Probe und die vor dem S1-Verdau geschützten Bereiche schematisch dargestellt. Sie ergeben eine Bande von 160 Basen für das Positiv-Strang-Genom und von 122 Basen für die N-mRNA. Die geschützten Fragmente wurden nach dem Verdau auf einem 8%igen Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die kleineren Banden sind durch den Nuklease-Verdau bedingte Degradationsprodukte. Der Größenmarker ist pBr322 mit Hpa II verdaut und mit ^{32}P -dCTP und in Gegenwart von Klenow-Polymerase endmarkiert.

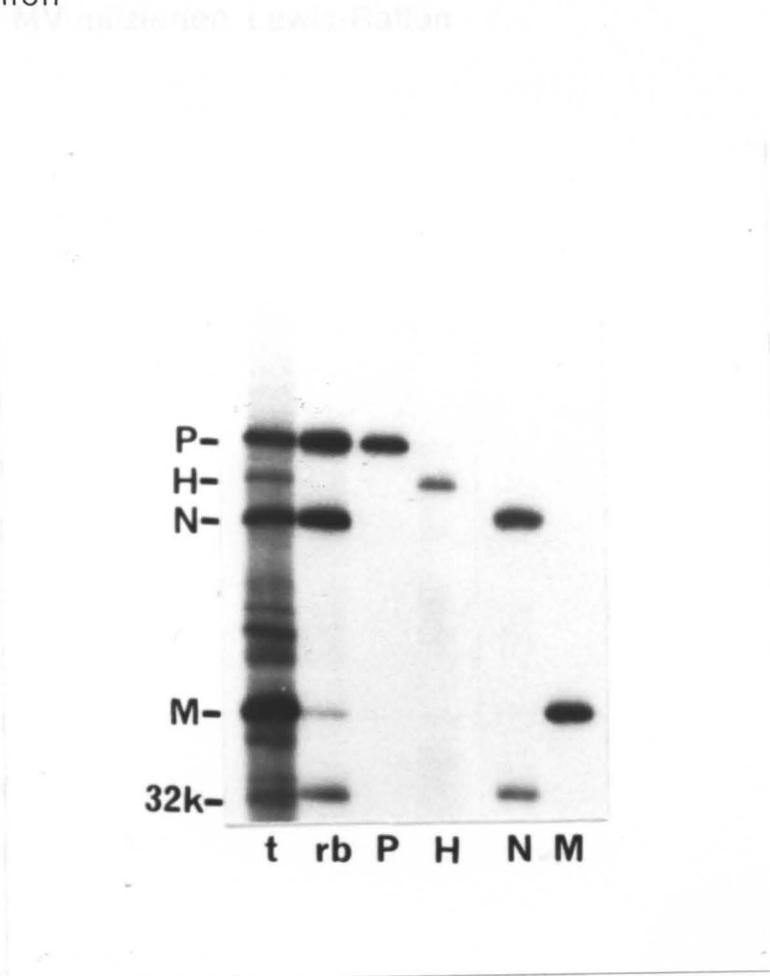
4. 2. In vitro Translation viraler mRNA aus lytisch infizierten Gewebekulturzellen

Zur Beurteilung der biologischen Aktivität der aus infizierten Gewebekulturzellen isolierten +pA-Fractionen wurden in einem zellfreien in vitro Translationssystem Versuche durchgeführt. In diesem Testsystem ist es möglich, Translationsprodukte der in den Zellen vorhandenen zellulären und viralen mRNAs zu erhalten. Die Identifizierung der viralen Proteine erfolgt mit Hilfe der Immunpräzipitation durch virusspezifische Hyperimmunseren oder monospezifische Antikörpern, wodurch die MV-spezifischen Translationsprodukte von den zellulären abgetrennt werden. Das Ergebnis

eines solchen Experiments zur Darstellung der in vitro Translationsprodukte aus lytisch infizierten Gewebekulturzellen ist in Abb. 14 für mit Edmonston-Virus infizierte Verozellen gezeigt. Spur 1 zeigt das totale Translat, Spur 2 dessen Immunpräzipitation mit polyklonalem Kaninchen-anti-MV Hyperimmunserum, die Spuren 3 - 6 stellen die Präzipitationen des totalen Translats mit monospezifischen Antiseren dar, die vier verschiedene MV-Strukturproteine erkennen.

Das in vitro produzierte H-Protein (in vivo 80 kD) ist kleiner als das P-Protein (in vivo 70 kD), da das verwendete in vitro Translationssystem nicht in der Lage ist, posttranslationelle Modifikationen wie Glykosylierung durchzuführen. Das in vitro synthetisierte H-Protein wurde vom Kaninchen-Hyperimmunserum zudem nur sehr schlecht erkannt, da die hauptantigenen Determinanten dieses Proteins im Bereich der Glykosylierungsstellen lokalisiert sind (Rima et al., 1987, Baczko, pers. Mitteilung). F-Protein konnte in diesem Versuch und in allen folgenden in vitro Translationsexperimenten nicht dargestellt werden, da kein spezifischer Antikörper zur Verfügung stand, der mit dem in vitro produzierten Protein eine deutlich nachweisbare Reaktion zeigte. Das in Spur N vorhandene 32 kD große Protein war ein nur in in vitro Experimenten auftretendes Translationsprodukt, das durch anti-N-Antikörper präzipitiert wurde und möglicherweise auf eine interne Initiation der N mRNA zurückzuführen ist (Baczko, pers. Mitteilung).

Abb. 14
In vitro Translation der +pA-RNA aus lytisch infizierten
Verzellen



Die aus dem Gewebe extrahierte RNA wurde mittels der Flüssighybridisierungsmethode mit einer ^{32}P -markierten

+pA-RNA aus lytisch mit Edmonston-Virus infizierten Verzellen wurde in einem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat in Gegenwart von ^{35}S -markiertem Methionin in vitro translatiert. Ein Aliquot wurde direkt auf einem 10%igen SDS-Polyacrylamidgel analysiert. Die restlichen Aliquots wurden mit verschiedenen anti-MV-Antisera immunpräzipitiert.

t = totales Translat, rb = Immunpräzipitation mit Kaninchen-anti-MV-Hyperimmunserum, P = polyklonales anti-P-Serum, H = monospezifisches anti-H-Serum, N = monoklonaler anti-N-Antikörper, M = polyklonales anti-M-Serum. Der anti-N-Antikörper präzipitiert zusätzlich ein 32 kD großes Protein.

4. 3. Charakterisierung virusspezifischer Genexpression in MV-infizierten Lewis-Ratten

4. 3. 1. Organspezifität der Expression MV-spezifischer Transkripte

Da bei der akuten Masernerkrankung des Menschen MV in verschiedenen Organen nachgewiesen werden kann, wurde in einer ersten Versuchsreihe von insgesamt 24 infizierten Lewis-Ratten zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion Großhirn, Kleinhirn, Leber, Niere, Lunge, Milz, Thymus, Knochenmark und Rückenmark sowie Zellelemente der Blutes entnommen und auf die Expression MV-spezifischer RNA untersucht. Die Organentnahme erfolgte an jeweils zwei Tieren pro Tag in einem Untersuchungszeitraum von 3 - 14 Tagen nach Virusinokulation ohne Berücksichtigung einer klinischen Manifestation der ZNS-Infektion.

Die aus den Geweben extrahierte RNA wurde mittels der Flüssighybridisierungsmethode mit einer ^{32}P -markierten einzelsträngigen DNA-Probe hybridisiert. Diese Nachweismethode wurde aufgrund ihrer hohen Sensitivität gewählt und als virusspezifische Probe die N-Gen-spezifische cDNA eingesetzt, da die N-spezifische mRNA in der höchsten Konzentration aller viralen Transkripte in der lytisch infizierten Zelle vorliegt.

MV-spezifische Transkripte fanden sich ab dem 6. Tag nach der Inokulation immer in den Gehirnen der untersuchten Tiere

Tab. 4
Expression MV-spezifischer Transkripte in Lewis-Ratten mit
AE

	Großh.	Kleinh.	R.mark	K.mark	Blut	Thymus	Milz
dpi							
3	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
4	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
5	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
6	+ / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
7	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
8	+ / + / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -
9	+ / + / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	n. d.
10	+ / +	n. d.	- / -	- / -	n. d.	- / -	- / -
11	+ / +	- / -	- / -	- / -	- / -	- / -	n. d.
12	+ / + / +	- / -	- / -	- / -	- / -	+ / -	- / -
13	+ / + / +	+ / +	- / -	n. d.	n. d.	- / -	- / -
14	+ / + / +	+ / +	- / -	- / -	n. d.	- / -	- / -

Je 10 µg gesamte RNA aus den jeweiligen Organen wurden in Nuklease-S1-Hybridisierungsexperimenten mit der in Abb. 3 beschriebenen N-spezifischen, ³²P-markierten, einzelsträngigen DNA-Probe hybridisiert. Die geschützten Bereiche wurden anschließend auf einem 8% Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als positive Kontrolle wurden jeweils 10 µg gesamte RNA aus lytisch infizierten Gewebekulturzellen hybridisiert. Einzelne (+)- oder (-)-Zeichen bedeuten Expression bzw. keine Expression N-spezifischer Sequenzen innerhalb der angegebenen Nachweisgrenzen jeweils eines Tieres (4. 1. 3.). Die Organe wurden zu den jeweils angegebenen Zeitpunkten nach der Infektion ohne Rücksicht darauf entnommen, ob die Tiere sichtbare Anzeichen der Erkrankung zeigten oder nicht. Außer den in der Tabelle aufgelisteten Organen wurden noch bis dpi 12 Leber, Lunge und Niere der Tiere untersucht, die stets kein Hybridisierungssignal ergaben.

(dpi = Tage nach intrazerebraler Inokulation mit CAM-MV. Die Abkürzungen bezeichnen: Großh. = Großhirn, Kleinh. = Kleinhirn, R.mark = Rückenmark, K.mark = Knochenmark, n.d. = nicht durchgeführt).

(Tab. 4). Dabei nahm die Expression der N-spezifischen mRNA etwa bis dpi 12 stetig zu (Abb.15), und blieb dann in etwa konstant. Eine Korrelation der intrazerebralen MV-Expression und der äußerlichen Manifestation der akuten Enzephalitis ließ sich nicht eindeutig feststellen. Die Tiere waren bereits ab dpi 8 ausnahmslos schwer erkrankt, während die MV-Expression zu diesem Zeitpunkt noch nicht das Maximum erreicht hatte. In Kleinhirn fanden sich erst ab dpi 13 MV-spezifische Transkripte.

Der Nachweis der Expression des MV in den anderen untersuchten Organen und dem Blut gelang, bis auf eine Ausnahme, nicht. Bei einem Tier konnte ein MV-spezifisches Signal für die aus Thymusgewebe isolierte RNA gezeigt werden, das allerdings nur sehr schwach war (Tab. 4).

Mit der gegensträngig orientierten M13-DNA-Probe (mp 8/3b) war weder im Gehirn noch in den anderen Geweben der Nachweis der negativsträngigen genomischen RNA möglich.

4. 3. 2. Expression MV-spezifischer Transkripte in Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE und SAME

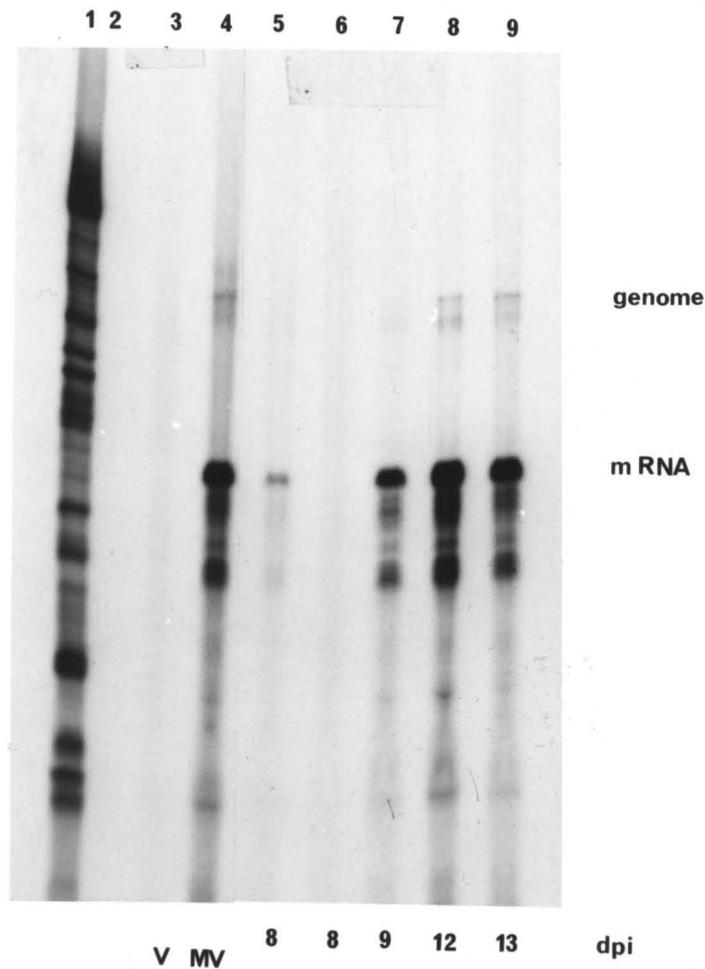
In diesem Versuchsansatz wurde die Expression MV-spezifischer Transkripte in den Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE und SAME zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Inokulation untersucht, um eine mögliche Korrelation N-Gen-spezifischer Sequenzen und der Inkubationszeit der beiden unterschiedlichen ZNS-Infektionen zu untersuchen. Für dieses Experiment wurde die RNA aus den Gehirnen von fünf Tieren mit AE (dpi 8 - 13) und elf Tieren mit SAME (dpi 21 - 58) extrahiert, die alle zum Zeitpunkt der Organentnahme klinische Zeichen der jeweiligen Erkrankung zeigten. Die gesamt-RNAs wurden wiederum mittels der Flüssighybridisierungsmethode auf die Expression N mRNA-spezifischer Sequenzen untersucht.

Das Ergebnis dieses Experiments ist für die Lewis-Ratten mit AE in Abb. 15 dargestellt. In den Kontrollspuren (1 - 4) sind die nicht hybridisierte Probe (Spur 1), die Nuklease-verdaute Probe (Spur 2), die mit RNA aus nicht infizierten (Spur 3) und infizierten Verozellen (Spur 4) hybridisierte Probe aufgetragen. Die positive Kontrolle in Spur 4 zeigt die beiden Signale für die mRNA und die genomische RNA positiver Polarität des N-Gens.

Die RNAs aus den Rattengehirnen (in den Spuren 5 - 9, dpi 8 - 13) zeigten, bis auf eine Ausnahme, ein MV-spezifisches Signal, das in seiner Stärke bis dpi 12 zunahm. Auch die positiv-strängige genomische RNA ist in den Spuren 6 - 9 als schwache Doppelbande erkennbar.

Abb. 15

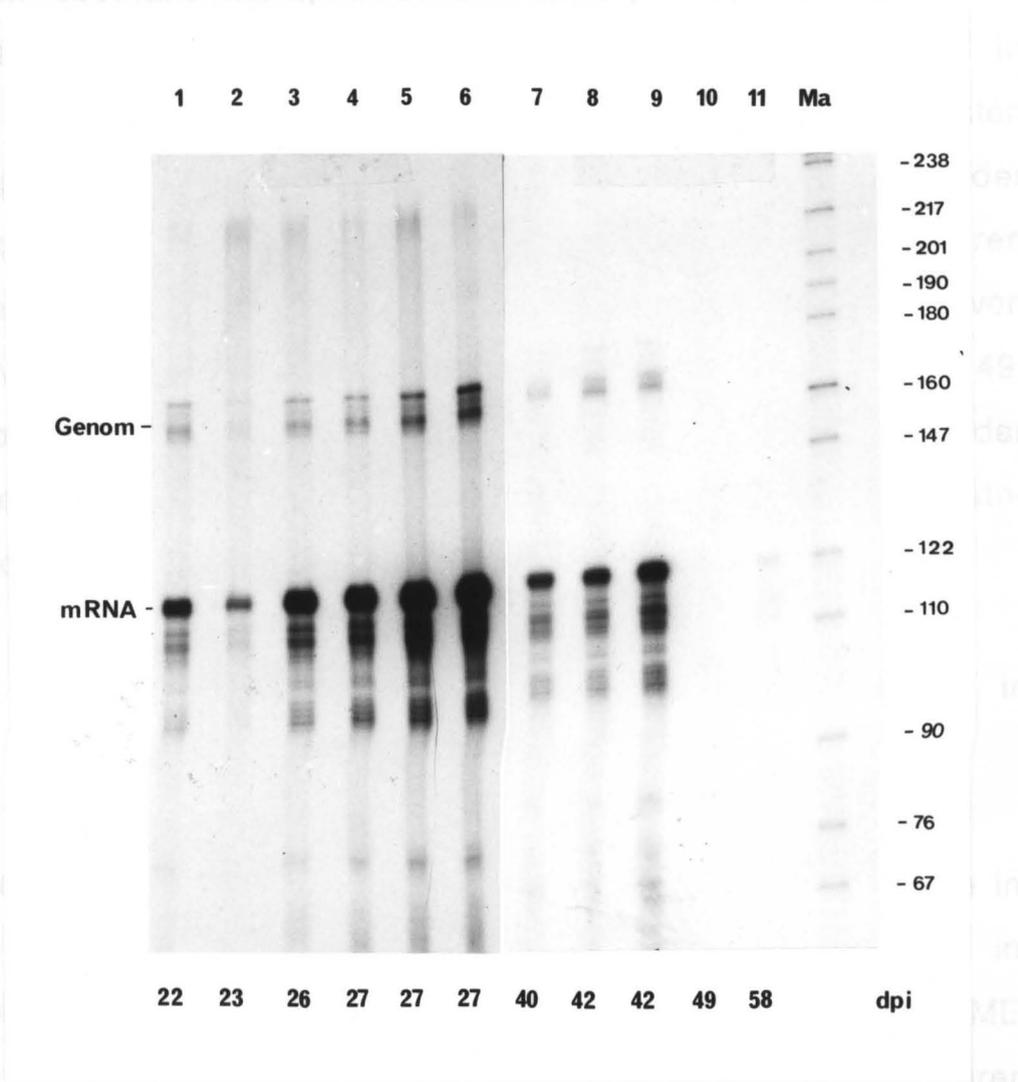
Nachweis MV-spezifischer RNA in gesamter RNA aus Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE



Das 230 Basen lange Pst I/Bam HI-Fragment vom 3' -Ende des N-Gens (siehe Abb. 13) wurde markiert und als Hybridisierungsprobe mit jeweils 10 µg gesamter RNA aus dem Gehirn von vier Wochen alten Lewis-Ratten, die zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation mit CAM-Virus getötet worden waren, hybridisiert. Nach der Flüssighybridisierung wurde ein Nuklease S1-Verdau durchgeführt und die geschützten Bereiche über ein 8%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt. In den Spuren 1 - 4 sind die Kontrollen dargestellt: Spur 1: Probe, Spur 2: nicht hybridisierte Probe, S1-verdaut, Spur 3: nicht infizierte Verozellen (V), Spur 4: infizierte Verozellen(MV). In den Spuren 5 - 9 sind die RNAs aus Lewis-Ratten mit AE zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation mit CAM-Virus aufgetragen (dpi 8 - 13).

Abb. 16

Nuklease S1-Kartierung MV-spezifischer Transkripte in den Gehirnen von Lewis Ratten mit SAME



Je 10 µg gesamte RNA aus den Gehirnen von Lewis-Ratten mit SAME zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation mit CAM-Virus wurden mit der in Abb. 13 dargestellten einzelsträngigen N-Gen-spezifischen ssDNA-M13-Probe hybridisiert, Nuklease S1-verdaut und die geschützten Bereiche anschließend über ein 8%iges Polyacrylamidgel aufgetrennt. Die nicht abgebildeten Kontrollspuren entsprachen denen in Abb. 15 (Spur 1 - 4). In den Spuren 1 - 11 sind die RNAs von Tieren mit SAME in einem Infektionszeitraum von 22 bis 58 Tagen nach der Inokulation aufgetragen. Der Größenmarker (Ma) ist ein mit Hpa II-verdautes pBr322-Plasmid, das mittels ^{32}P -dCTP und Klenow-Polymerase endmarkiert wurde.

In aus den Gehirnen von Tieren mit SAME isolierter RNA ließen sich ebenfalls MV-spezifische Transkripte sowohl für die N-Gen-spezifische mRNA als auch die genomische RNA in unterschiedlicher Menge nachweisen (Abb. 16). Die stärksten Signale waren in diesem Experiment 27 Tage nach der Inokulation zu sehen (in den Spuren 4 - 6). Zu späteren Zeitpunkten (in den Spuren 7 - 9, 11) war die Expression von MV-spezifischen Transkripten geringer. In einem Tier (dpi 49, Spur 10) ließ sich mit der angegebenen Sensitivität der Methode auch nach längeren Expositionszeiten des Autoradiogramms keine N-Gen-spezifische mRNA nachweisen.

4. 3. 3. Nachweis einzelner MV-spezifischer-Strukturgene in den Gehirnen von Lewis-Ratten

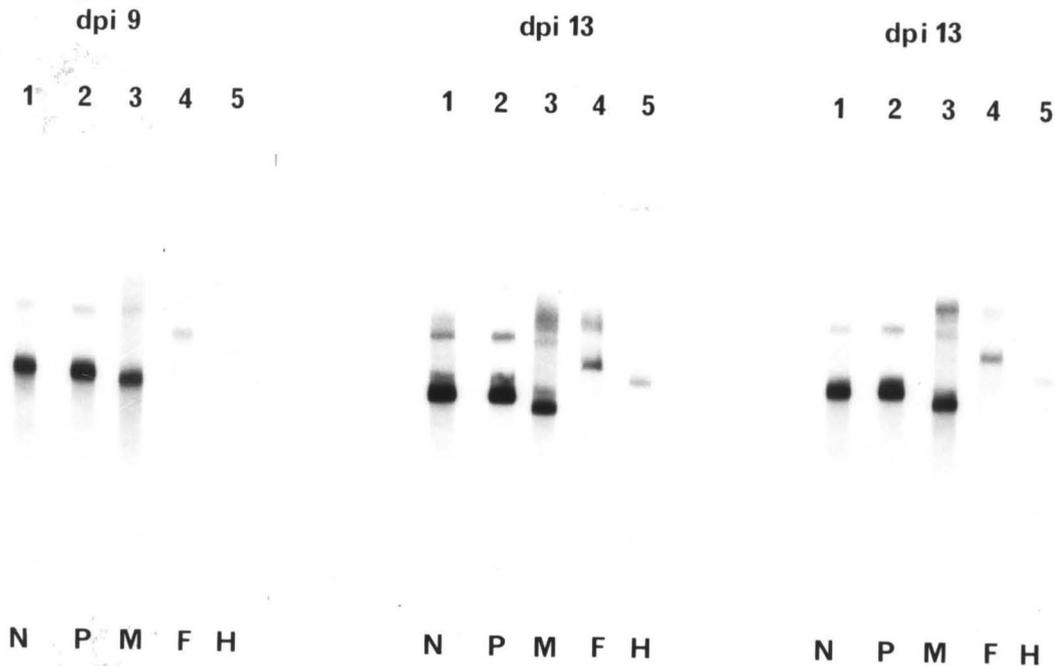
Die Expression der MV-Strukturgene N, P, M, F und H wurde in den folgenden Experimenten mittels Northern Blot Analysen in den RNAs aus den Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE und SAME untersucht. Die Northern Blot Analysen sind trotz geringerer Sensitivität für die qualitative Analyse der viralen Genexpression eher geeignet als die Flüssighybridisierungsmethode, da letztere nur den Nachweis einer viralen Sequenz in der Länge der verwendeten Probe zuläßt, jedoch keine weitere Aussage über die Größe und die relative Konzentration der jeweiligen gesamten mRNA erlaubt. Als Kontrolle für die Hybridisierungsexperimente mit den +pA-RNAs aus den analysierten Rattenhirnen wurde jeweils die +pA-RNA aus lytisch infizierter Gewebekultur im selben Experiment hybridisiert.

4. 3. 3. 1. Nachweis MV-spezifischer Strukturgene in den Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE

RNAs wurden aus den Gehirnen von akut erkrankten Lewis-Ratten (Tiere mit AE) nach verschiedenen Zeitintervallen nach der Infektion isoliert. In Abb. 17 sind exemplarisch die Northern Blot Analysen von +pA-RNAs aus den Gehirnen dreier Lewis-Ratten mit AE gezeigt, die 9 bzw. 13 Tage nach Virusinokulation extrahiert worden waren. Die mit den für jedes Gen spezifischen hybridisierten Nitrozellulosestreifen wurden entsprechend der Genordnung (Abb. 1a) angeordnet. In allen Gehirnen waren hohe Expressionsraten für die mRNAs der ersten drei Strukturgene (N, P und M) zu sehen (jeweils in den Spuren 1 - 3). Ein von der lytischen Infektion in der Zellkultur stark unterschiedliches Expressionsmuster fand sich jedoch für die beiden mRNAs der viralen Glykoproteine F und H. Bereits wenige Tage nach der Infektion mit dem CAM-Virus wurde die mRNA des F-Gens nur noch in sehr geringem Maße transkribiert, während die mRNA für das H-Gen so gut wie nicht nachweisbar war. Der Effekt der restringierten Genexpression der mRNAs der beiden viralen Glykoproteine war in allen untersuchten Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE (insgesamt wurden 26 Tiere analysiert) in gleicher Weise vorhanden.

Abb. 17

Northern Blot Analyse von mRNAs aus den Gehirnen von drei Lewis Ratten mit AE



RNA aus den Gehirnen von drei an AE erkrankten Lewis-Ratten wurde 9 bzw. 13 Tage nach der Infektion isoliert und +pA-selektiert. Je 10 μ g +pA-RNA pro 3 cm Kammbreite wurden jeweils in einem denaturierenden formaldehydhaltigen 1%igen Agarosegel aufgetrennt und auf Nitrozellulose transferiert. Einzelne Streifen dieser Blots wurden mit jeweils einer für die mRNA eines MV-Strukturgens spezifischen, 32 P-markierten einzelsträngigen RNA-Probe hybridisiert. Nach der Waschprozedur wurden die einzelnen Streifen jeder RNA der Genordnung des MV-Genoms folgend montiert: Spur 1: N, Spur 2: P, Spur 3: M, Spur 4: F, Spur 5: H. Die Expositionsdauer betrug in diesem Experiment 2 Stunden.

Aus den RNA-Analysen isolierter Gehirn-RNAs akut und subakut erkrankter Lewis Ratten ergaben sich jeweils die gleichen Expressionsprofile MV-spezifischer mRNAs: Hohe Transkriptionsraten für die ersten drei Strukturgene N, P und M

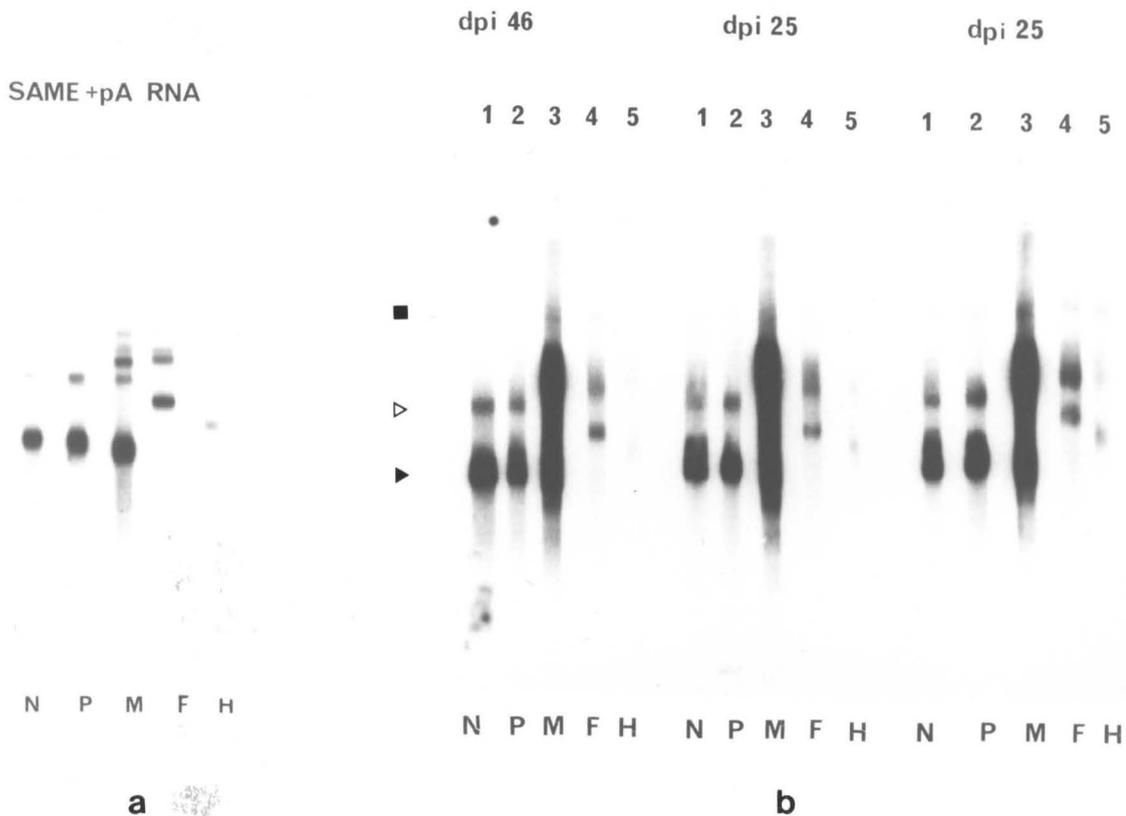
4. 3. 3. 2. Nachweis MV-spezifischer Strukturgene in den Gehirnen von Lewis-Ratten mit SAME

Um die Expression der MV-RNA in der persistierenden Infektion zu charakterisieren, wurden zunächst Northern Blot Analysen an gesamter RNA, die aus den Gehirnen subakut erkrankter Tiere zu verschiedenen Zeitpunkten nach der Infektion isoliert wurde, durchgeführt. Das Ergebnis dieser Experimente ist in Abb. 18 dargestellt. Die für die Gehirn-RNAs der akut erkrankten Tiere beschriebene Restriktion der Genexpression der mRNAs der gps F und H ließ sich auch in allen untersuchten Gehirnen der subakut erkrankten Tiere dokumentieren (Abb. 18b, jeweils in den Spuren 4 und 5). Für die Transkriptionsrate des M-Gens läßt sich an gesamter RNA keine Aussage treffen, da die M-spezifische Probe zusätzlich mit zellulären Sequenzen hybridisiert (siehe auch 4. 1. 1.). Die Northern Blot Analyse der +pA-RNA aus dem Gehirn eines Tieres mit SAME (dpi 32) ist in Abb. 18a exemplarisch dargestellt. Es zeigt sich, daß, wie in der AE, auch in der SAME das M-Gen sehr effizient transkribiert wird. Polycistronische Transkripte sind in allen untersuchten RNAs ebenfalls nachweisbar (Abb. 18 a,b). In Abb. 18b ist zusätzlich als schwache Bande bei jeder Hybridisierungsprobe in gleicher Höhe die genomische RNA zu sehen.

Aus den RNA-Analysen isolierter Gehirn-RNAs akut und subakut erkrankter Lewis-Ratten ergaben sich jeweils die gleichen Expressionsprofile MV-spezifischer mRNAs: Hohe Transkriptionsraten für die ersten drei Strukturgene N, P und M

Abb. 18

Northern Blot Analyse von RNAs aus subakut erkrankten Lewis-Ratten (Tiere mit SAME)



Hybridisierungssignal für die N-mRNA ergab weitestgehend

RNA aus Gehirnen von SAME-Tieren mit unterschiedlichen Inkubationszeiten wurde isoliert, Northern blots angefertigt und mit MV-spezifischen, ^{32}P -CTP-markierten RNA-Proben hybridisiert.

a. +pA-RNA aus dem Gehirn eines SAME-Tieres 32 Tage nach der Infektion

b. Gesamte RNA aus den Gehirnen von drei SAME-Tieren 46 bzw. 25 Tage nach der Infektion. Die Position der monocistronischen Transkripte ist durch geschlossene (▴), die der polycistronischen Transkripte durch offene (▷) Pfeilspitzen gekennzeichnet. In Abb. 18b ist zusätzlich die Position der genomischen RNA (■) markiert.

Die Expositionsdauer der Autoradiographie betrug 4 Stunden.

den Gehirnen subakut erkrankter Tiere (Abb. 19b). Die Analyse

und eine offensichtlich stark restringierte Expression der gp-spezifischen mRNAs. Diese Restriktion betraf vor allem das H-Gen und war anscheinend unabhängig von der Dauer der ZNS-Infektion.

4. 3. 3. 3. Quantitative Analysen der Northern Blots

Zur weiteren Charakterisierung der relativen Transkriptionsraten der einzelnen MV-Strukturgene wurden quantitative Auswertungen der hybridisierten Northern Blots vorgenommen. MV-spezifische Banden wurden aus den Nitrozellulosestreifen ausgeschnitten und die β -Zerfälle im Szintillationszähler gezählt.

Die graphische Darstellung der absoluten Zählerwerte (Abb. 19a) läßt erkennen, daß bei gleichen Mengen aufgetragener +pA-RNA die lytisch infizierte Gewebekultur ein im Vergleich zu den Gehirn-RNAs der Tiere mit AE etwa fünfmal stärkeres Hybridisierungssignal für die N-mRNA ergab. Weiterhin ist ersichtlich, daß die mRNAs der ersten drei Strukturgene N, P und M in der akuten Enzephalitis etwa gleich stark exprimiert und nicht, wie in der lytischen Infektion, vom N-Gen zum M-Gen annähernd linear abgeschwächt transkribiert wurden. Dann allerdings fiel der Gradient steil ab und die F- und H-spezifischen mRNAs waren kaum noch nachweisbar.

Der Verlauf des Expressionsgradienten war nicht nur für die quantifizierten MV-mRNAs aller AE-Tiere gleich, sondern entsprach auch dem Expressionsmuster der MV-Infektion in den Gehirnen subakut erkrankter Tiere (Abb. 19b). Die Analyse

Abb. 19

Quantitative Analysen der MV-spezifischen RNA-Expression von akut und subakut erkrankten Lewis-Ratten

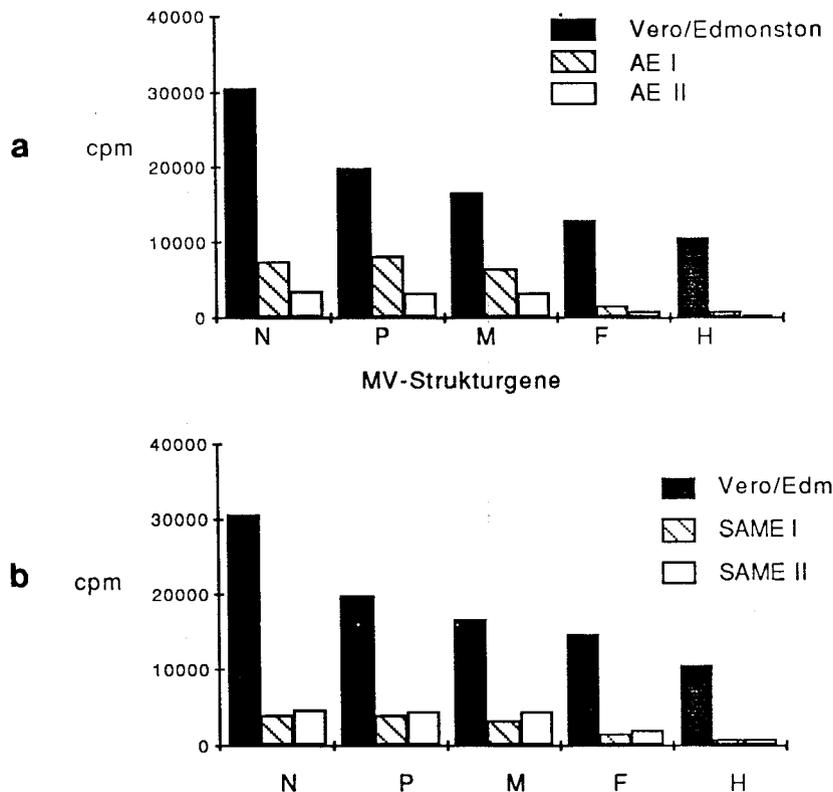
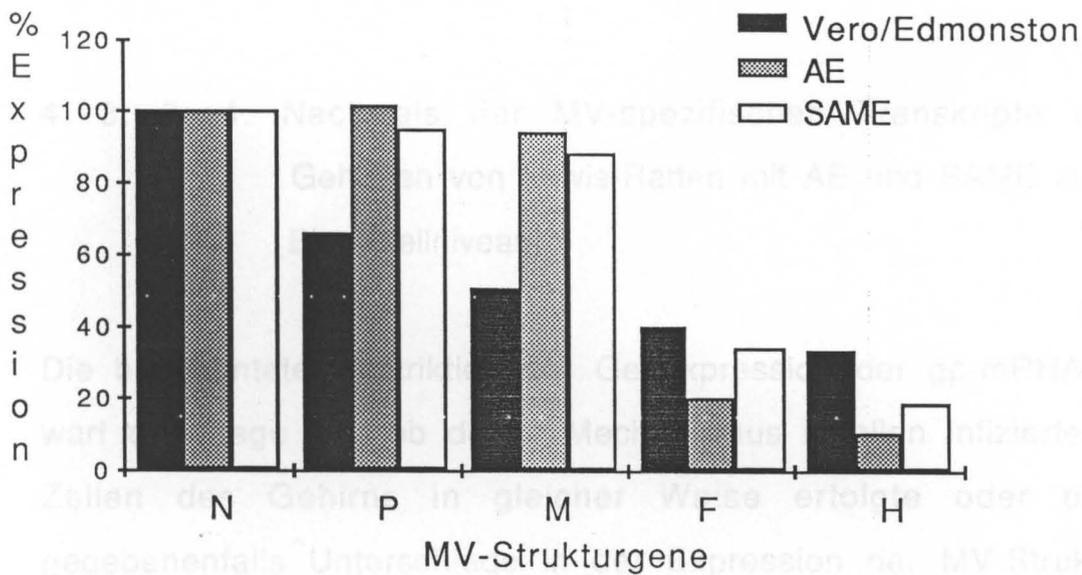


	Abb. 19a		Abb. 19b		
Vero/Edm	AE I	AE II	SAME I	SAME II	
N	30 605	7521	4973	3961	4704
P	21 262	7813	4878	4012	4583
M	18 512	6759	4912	3413	4601
F	15 419	1950	812	1012	1810
H	11 950	700	250	634	593

Die MV-spezifischen Hybridisierungssignale der Northern Blots aus Abb. 17 und 18 (zusätzlich zu Abb. 18a einer hier nicht dokumentierten +pA-RNA aus dem Gehirn eines Tieres mit SAME) wurden nach der Autoradiographie aus den Nitrozellulosestreifen ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die absoluten Zählerwerte sind als Blockhistogramme für die RNAs aus zwei AE-Tieren (AE I und AE II) (Abb. 19a) und zwei SAME-Tieren (SAME I und SAME II) (Abb. 19b) und einer Referenz-RNA aus lytisch mit Edmonston-Virus infizierten Verozellen aufgetragen. Die ermittelten Zählerwerte für die β -Zerfälle sind als cpm in der Tabelle einzeln aufgeschlüsselt.

Abb. 20
Quantitative Analyse der MV-Genexpression in den
Gehirnen von akut und subakut erkrankten Lewis-Ratten



Die absoluten Zählerwerte aus den Nitrozellulosestreifen aus Abb. 17 und 18 wurden, um sie von experimentell bedingten Variablen unabhängig zu machen, relativ zur jeweiligen Expression der N mRNA (N = 100%) berechnet und als Blockhistogramm dargestellt. Als Vergleichs-RNA wurde die RNA aus lytisch mit Edmonston-Virus infizierter Zellkultur aufgetragen. Die Daten ergeben sich als Mittelwerte von je 4 Lewis-Ratten mit AE und 4 Lewis-Ratten mit SAME mit jeweils unterschiedlicher Inkubationszeit der Erkrankung.

der Zählerwerte für die aus der in Abb. 18a gezeigten und einer weiteren, nicht abgebildeten +pA-RNA aus dem Gehirn von Tieren mit SAME ergaben, daß sich quantitativ ein ähnliches Expressionsmuster für die viralen mRNAs wie in den Tieren mit AE erkennen ließ. Auch der deutliche Abfall des

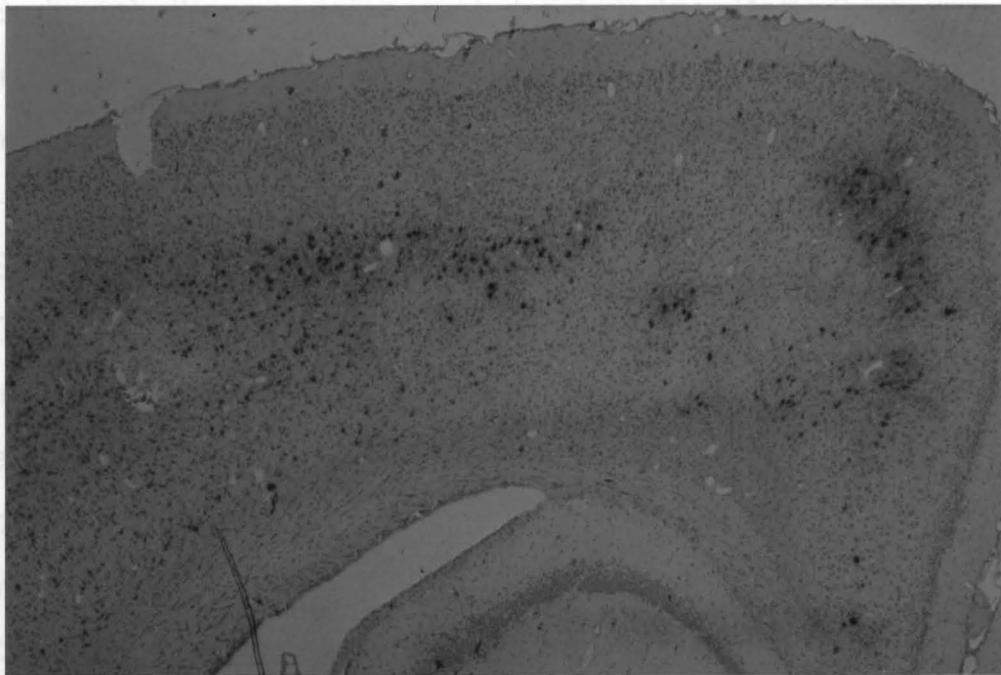
Expressionsgradienten nach dem M-Gen war nachzuweisen. Dies ist besonders deutlich in Abb. 20 zu erkennen, in der die Expressionshäufigkeiten der einzelnen mRNAs der P-, M-, F- und H-Gene relativ zur jeweiligen Expression des N-Gens berechnet wurden (Abb. 20).

4. 3. 3. 4. Nachweis der MV-spezifischen Transkripte in Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE und SAME auf Einzelzellniveau

Die beobachtete Restriktion der Genexpression der gp-mRNAs warf die Frage auf, ob dieser Mechanismus in allen infizierten Zellen des Gehirns in gleicher Weise erfolgte oder ob gegebenenfalls Unterschiede in der Expression der MV-Strukturgene auf Einzelzellniveau beobachtet werden konnten. Zur Darstellung der MV-spezifischen Genexpression in den Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE und SAME wurden in situ Hybridisierungsexperimente durchgeführt. In Abb. 21 wurde an einem formalinfixierten paraffin-eingebetteten Präparat in einer Übersicht die Infektionsausbreitung im Gehirn eines Tieres mit AE (dpi 12) mit einer doppelsträngigen N-spezifischen ³⁵S-markierten Probe dargestellt. Foci infizierter Zellen fanden sich in großer Anzahl in der grauen Substanz der Großhirnrinde. Vereinzelt waren auch infizierte Zellen in der weißen Substanz durch positive Hybridisierungssignale markiert. Die Doppelstrangprobe erlaubte jedoch keine Aussage darüber, ob es sich um den Nachweis des viralen Genoms oder der mRNA handelte. Für die Analyse der

Abb. 21

Darstellung der MV-Expression im Gehirn einer Lewis-Ratte mit AE auf Einzelzellniveau



Frontalschnitt in Höhe der Commissura anterior (5 um dick) durch formalinfixiertes Gehirngewebe einer Lewis-Ratte mit AE (12 Tage nach der Infektion), das paraffineingebettet wurde. Die in situ Hybridisierung wurde mit einer nicktranslatierten, ^{35}S -dATP markierten N-spezifischen ds-DNA-Probe durchgeführt. Die Expositionsdauer betrug 4 Tage. Die Gegenfärbung erfolgte mit Hämalaun (Kernfärbung). Die Vergrößerung beträgt etwa 200.

Expression der einzelnen viralen Strukturgene wurden die bereits für die Northern Blot-Experimente benutzten RNA-Proben, die hier mit ^{35}S -UTP markiert wurden, verwendet. Serienschnitte von einem akut infizierten Rattenhirn wurden mit spezifischen Proben der verschiedenen Strukturgene hybridisiert. Für die Auswertung wurde jeweils gleiche Hirnareale gewählt, um die einzelnen Expressionsmuster der Strukturgene miteinander vergleichen zu können.

Die Ergebnisse eines in situ Hybridisierungsexperimentes sind in Abb. 22 dargestellt. Die N-spezifische mRNA-Probe zeigte ein positives Signal in einer großen Anzahl von Zellen, bei denen es sich, wie exemplarisch in Abb. 22a zu sehen, wahrscheinlich vorwiegend um Neurone handelte. Dies geht aus der Lokalisierung der Zellen im Gehirn und aus ihrer typischen Morphologie mit den erkennbaren dendritischen Zellfortsätzen hervor. Ein der N-spezifischen Probe sehr ähnliches Signal bezüglich der Hybridisierungseffizienz und der Verteilung der positiven Zellen war für die P-spezifische Probe zu beobachten, ebenso für die M-spezifische, die in Abb. 22b dargestellt ist. Unterschiedlich zu den Hybridisierungssignalen der genannten drei ersten Gene war jedoch die Verteilung der gp-mRNA positiven Signale: Eine weitaus kleinere Anzahl von Zellen exprimierte in nachweisbaren Mengen F-spezifische mRNA (Abb. 22c) und nur wenige Zellen wiesen ein positives Hybridisierungssignal für die H-mRNA auf (Abb. 22d).

Abb. 22
Expression der MV-Strukturgene im Gehirn eines Tieres mit AE
auf Einzelzellniveau

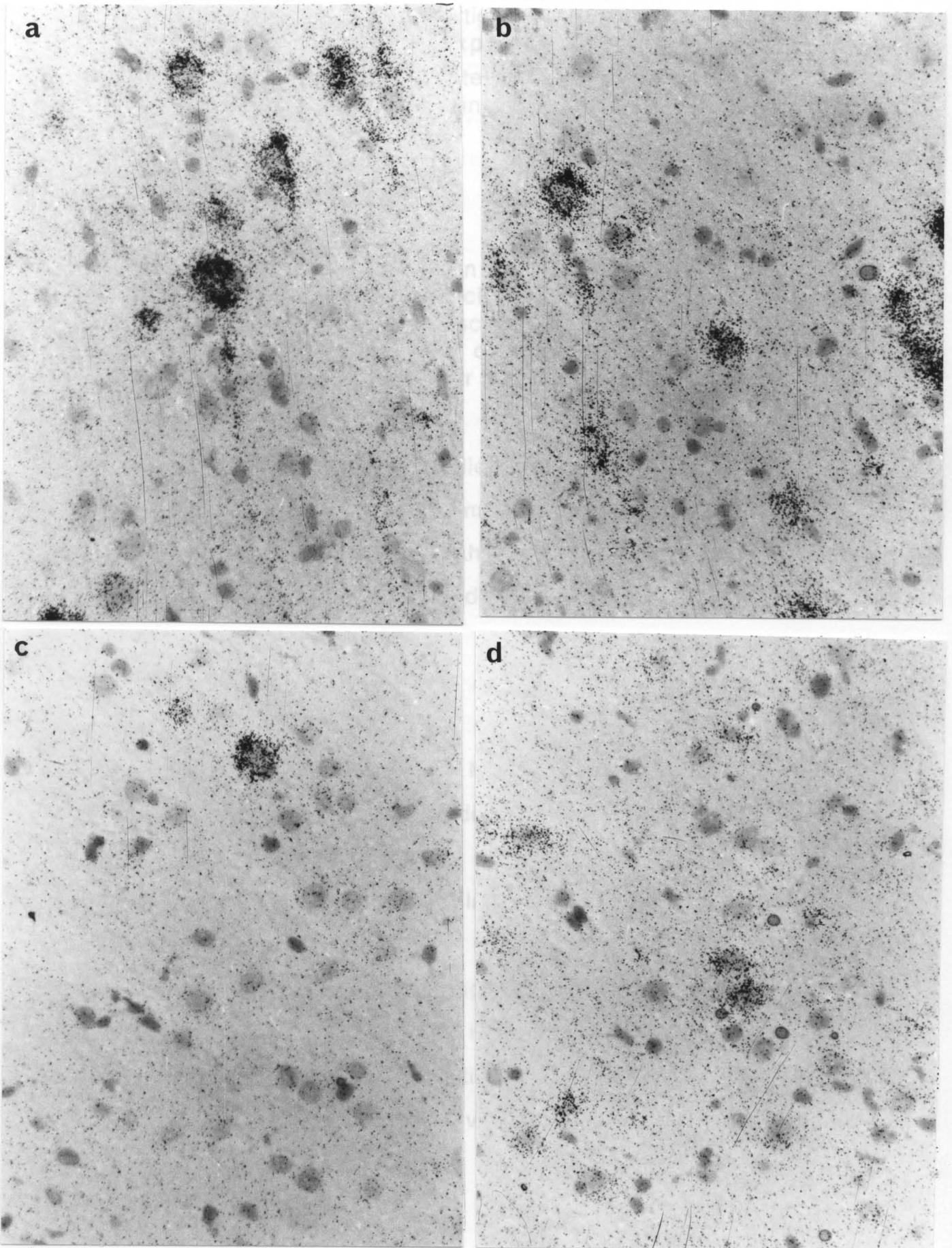


Abb. 22 a - d.

Vom Gehirn eines Tieres mit AE (dpi 11) wurden 6 um dicke Cryostatschnitte angefertigt und mit Azeton fixiert. In situ Hybridisierungsexperimente mit mRNA-spezifischen ^{35}S -UTP-markierten RNA-Proben für jedes Strukturgen wurden an aufeinanderfolgenden Schnitten durchgeführt.

- a. N-mRNA
- b. M-mRNA
- c. F-mRNA
- d. H-mRNA

Nach der Hybridisierung wurden die Präparate für 4 Tage autoradiographiert und anschließend mit Hämalaun gegengefärbt (die Zellkerne erscheinen bei dieser Färbung dunkel). Die Abbildungen a - d sind alle aus derselben Region der grauen Substanz der Zentralhirnrinde.

Dieses Experiment zeigte, daß die Transkription des F- und des H-Gens bereits in der AE nur noch in wenigen Zellen nachgewiesen werden konnte, während in einem Großteil der infizierten Zellen die Expression dieser mRNAs unterhalb der Nachweisgrenze der Methode lag.

Für die SAME war die Anzahl der Zellen, die F- und H-spezifische mRNAs exprimierten, noch geringer als in der AE und bezüglich der Intensität der Markierung der Zellen durch die in situ Hybridisierung oft an der Nachweisgrenze. Auf eine Dokumentation wurde deshalb an dieser Stelle verzichtet.

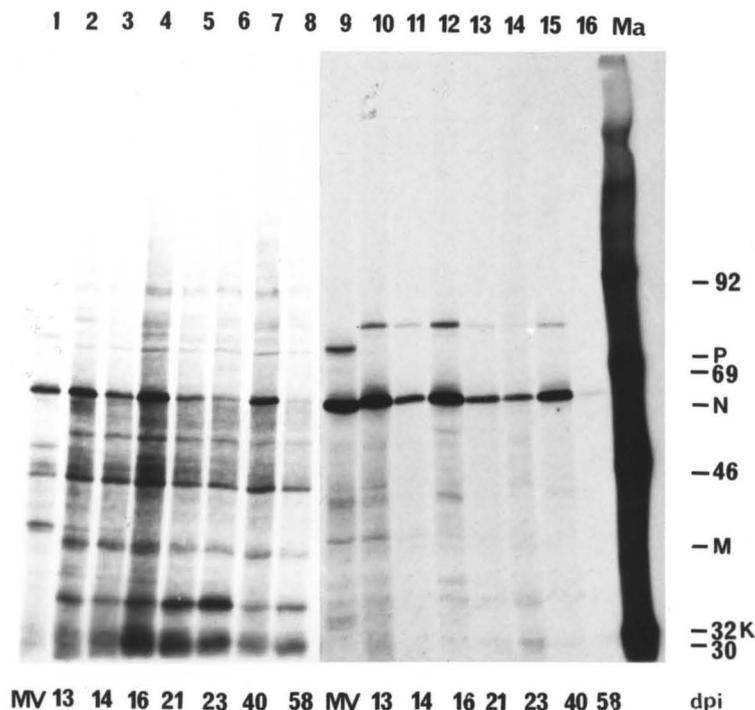
Die bisher erhaltenen Daten lassen erkennen, daß der Expressionsdefekt der viralen Glykoproteine Folge einer selektiven Abschaltung der zugehörigen mRNAs in den infizierten Zellen der Gehirne ist. Dieses Phänomen tritt bereits bei der akuten Enzephalitis in Erscheinung und ist in der subakuten Enzephalitis noch verstärkt.

4. 3. 4. In vitro Translation von +pA-RNAs aus den Gehirnen von akut und subakut erkrankten Lewis-Ratten

Die Befunde der immunhistologischen Untersuchungen an Hirnschnitten von infizierten Lewis-Ratten zum Nachweis viraler Strukturproteine in Hirnzellen hatten ergeben, daß M-, F- und H-Protein des MV nur in wenigen Zellen nachweisbar waren (siehe Tab. 2). Dieses Ergebnis ist besonders für das M-Protein unerwartet, da die mRNA für dieses Protein in hoher Konzentration vorlag. Zur Überprüfung der biologischen Aktivität der isolierten mRNAs wurden diese in einem zellfreien in vitro Translationssystem untersucht, da es in einem solchen System möglich ist, die Aktivität der mRNA unabhängig von zellulären Faktoren, die regulatorisch wirken oder die Stabilität der mRNA oder des Proteins beeinflussen können, zu überprüfen.

Für die folgenden Experimente wurden mRNAs aus Tieren mit AE und Tieren mit SAME, jeweils zu unterschiedlichen Zeiten nach der Infektion isoliert. Als Kontrolle diente mRNA aus lytisch infizierten Gewebekulturzellen. Die mRNAs wurden in Gegenwart von ^{35}S -markiertem Methionin in vitro translatiert. Die synthetisierten Proteine wurden anschließend mit Kaninchen-anti-MV-Hyperimmunserum immunpräzipitiert, um die MV-spezifischen Translationsprodukte von den zellulären Proteinen abzutrennen.

Abb. 23 In vitro Translation von +pA-RNAs aus den Gehirnen von Lewis-Ratten mit AE und SAME

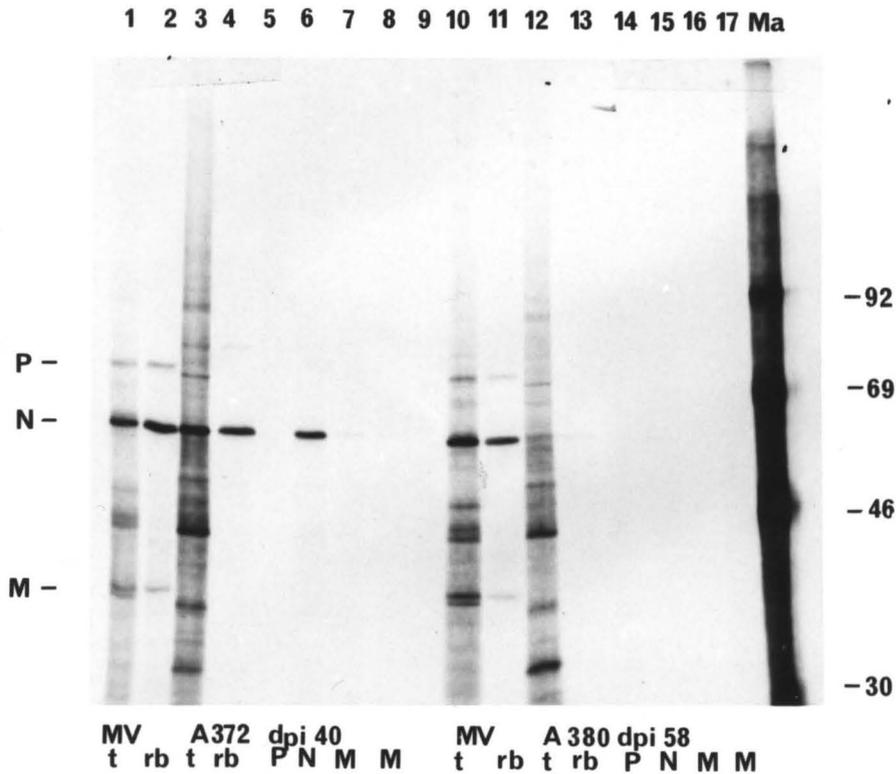


+pA-RNAs aus lytisch mit Edmonston infizierten Verzellen und aus Hirnen von akut und subakut erkrankten Ratten nach unterschiedlicher Inkubationsdauer der Erkrankung wurden in einem Kaninchen-Retikulozten-Lysat in Gegenwart von ^{35}S -Methionin in vitro translatiert. Aliquots der totalen Translationsprodukte wurden entweder direkt auf einem 10% Polyacrylamidgel analysiert (Spur 1 - 8) oder mit Kaninchen-anti-MV-Hyperimmunserum zur Darstellung der MV-spezifischen Translationsprodukte immunpräzipitiert (Spur 9 - 16). Die totalen Translationsprodukte sind dargestellt aus lytisch infizierter Zellkultur (Spur 1), den Gehirnen zweier Tiere mit AE (dpi 13, 14 in den Spuren 2 und 3) und aus Gehirnen von 5 Tieren mit SAME (dpi 16 - 58 in den Spuren

4 - 8). MV-spezifische Translationsprodukte der entsprechenden Immunpräzipitationen sind in den Spuren 9 - 16 aufgetragen. Man erkennt spezifische Banden für das N-, P- und das M-Protein in der Kontrollspur (9). Zur Verdeutlichung der Ergebnisse wurden für die totalen Translationsprodukte und deren Immunpräzipitation Autoradiographien mit unterschiedlicher Expositionszeit abgebildet. Als Größenstandard sind in der letzten Spur (Ma) ^{14}C -markierte Markerproteine aufgetragen, die aufgrund der langen Expositionszeit des Autoradiogramms (14 Tage) stark überexponiert sind. Der Größenstandard wurde auch in Abb. 30 verwendet.

Das Autoradiogramm der anschließend über ein Polyacrylamidgel aufgetrennten Proteine ist in Abb. 23 dargestellt. In den Spuren 1 - 8 sind die gesamten Translationsprodukte der mRNA-Fractionen aus infizierten Gewebekulturen und Rattenhirnen aufgetragen, in den Spuren 9 - 16 die entsprechenden Immunpräzipitationen. In der Immunpräzipitation der Kontroll-RNA (Spur 9) erschienen die für dieses System typischen Banden, die bereits in 4. 2. für die lytische Infektion von Gewebekulturzellen beschrieben wurden. Deutlich erkennbar sind - der Größe nach - die spezifischen Banden für das P-, das N- und das M-Protein. Die H-spezifische Bande war in der Kontrollspur nur sehr schwach zu sehen, ein F-spezifisches Translationsprodukt konnte nicht dargestellt werden. Die mRNAs aus den Gehirnen von Tieren mit AE (Spur 10 und 11) zeigten, bis auf das H-Protein, ein der Kontroll-RNA sehr ähnliches Bandenmuster. Das P-Protein war hier - wie in allen Rattenhirntranslationsprodukten - größer als in der Kontrolle, da die Kontroll-RNA aus mit Edmonston-Virus infizierten Verozellen isoliert wurde, das ein etwas

Abb. 24
In vitro Translation von +pA-RNAs aus den Gehirnen von zwei Tieren mit SAME



+pA-RNAs aus Gehirnen zweier Tiere mit SAME (dpi 40 und 58) und lytisch infizierten Gewebekulturzellen wurden in vitro translatiert und mit polyklonalem Hyperimmunserum oder monospezifischen Antiseren gegen N, P und M immunpräzipitiert. Die Präzipitationsprodukte und die totalen Translationsprodukte wurden auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In den Spuren 1, 3, 10 und 12 sind jeweils die totalen Translationsprodukte der mRNA-Fractionen aufgetragen (t), in den Spuren 2, 4, 11 und 13 deren Immunpräzipitationen mit Kaninchen-anti-MV-Hyperimmunserum (rb). Präzipitationen mit den monospezifischen Antiseren gegen P, N und M sind in den Spuren 5 - 8 bzw. 14 - 17 aufgetragen. Die Präzipitationsprodukte dieser Antiseren mit totalen Translationsprodukten aus lytisch infizierten Gewebekulturzellen ist in Abb. 14 dargestellt. Als Größenmarker ist in der letzten Spur (Ma) ein ¹⁴C-markierter Proteinstandard-Mix aufgetragen.

kleineres P-spezifisches Translationsprodukt als der CAM-Stamm bildete. Ein H-spezifisches Signal konnte in den aus Rattenhirn-mRNA translatierten Proteinen nicht gezeigt werden. Deutlich waren die N-spezifischen Translationsprodukte als stärkste Banden in den jeweiligen Spuren zu sehen und ebenso, wenn auch nur relativ schwach, das M-Protein.

Anders war die Darstellung der Translationsprodukte aus den Gehirn-RNAs der SAME-Tiere (in den Spuren 12 - 16). Wohl waren N- und P-spezifische Banden in unterschiedlicher Stärke zu sehen, in keinem untersuchten Fall konnte aber M-Protein auch unter Verwendung von M-Protein-spezifischen monoklonalen Antikörpern (Abb. 24) entdeckt werden.

4. 4. Nachweis MV-spezifischer Strukturgene im Gehirn von BN-Ratten

In BN-Ratten war es, wie in Lewis-Ratten, möglich, durch intrazerebrale Inokulation mit CAM-Virus sowohl eine akute als auch eine persistierende ZNS-Erkrankung hervorzurufen. Die persistierende ZNS-Infektion der BN-Ratten unterschied sich jedoch in ihrem klinischen Verlauf und ihrer Histopathologie von der der Lewis-Ratten. Ziel der folgenden Experimente war die Untersuchung, ob der unterschiedlichen Erkrankung der BN-Ratten ein anderes Expressionsmuster der MV-Strukturgene auf transkriptioneller oder translationeller Ebene zugrunde lag. Hierfür wurden, wie für die Lewis-Ratten beschrieben, Northern Blot Analysen der aus den Gehirnen von

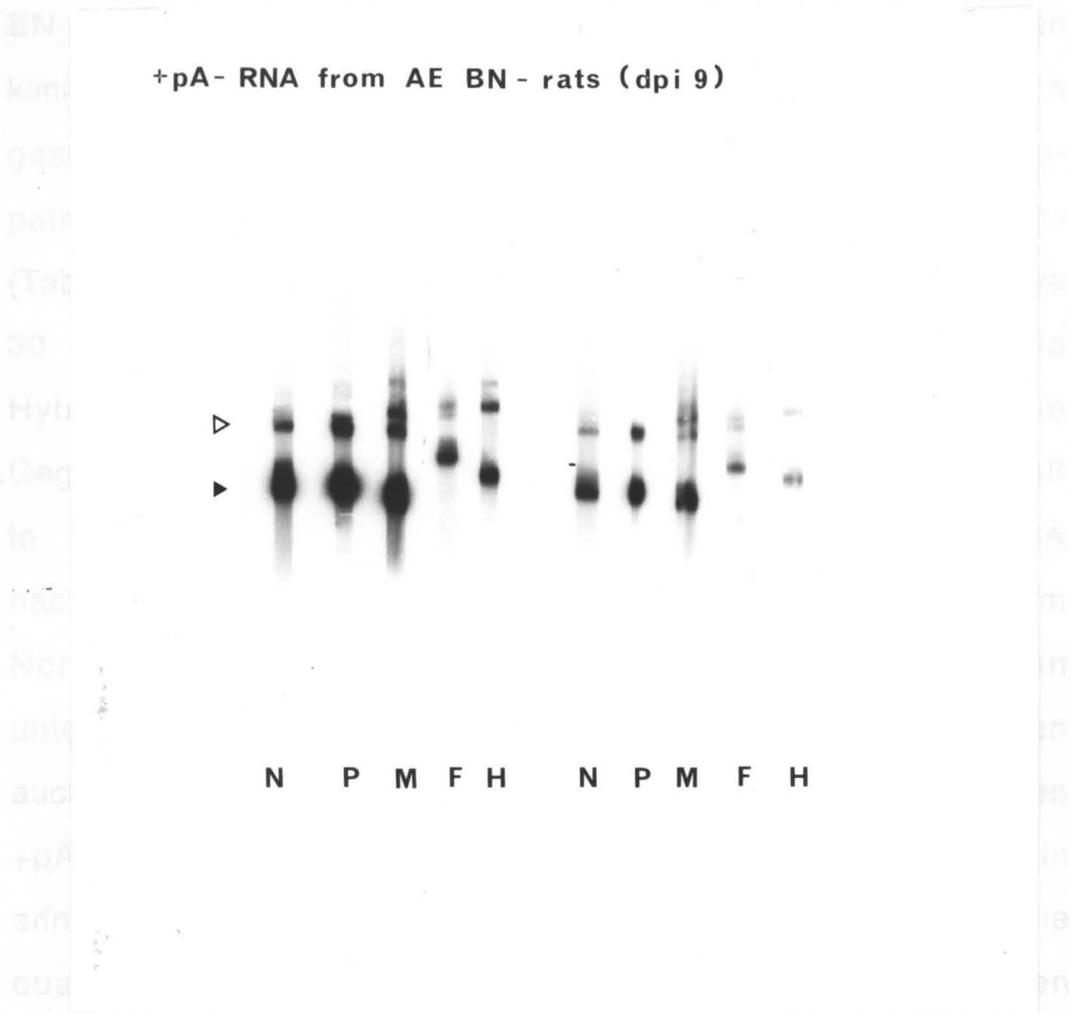
BN-Ratten mit AE oder CSE extrahierten +pA-RNAs durchgeführt. Die nachweisbaren virusspezifischen mRNAs wurden in in vitro Translationsexperimenten auf ihre biologische Aktivität untersucht.

4. 4. 1. Nachweis MV-spezifischer Strukturgene in BN-Ratten mit AE und CSE

4. 4. 1. 1. Expression des MV-Genoms in BN-Tieren mit AE

In Abb. 25 ist exemplarisch die mRNA aus Gehirnen zweier von insgesamt acht untersuchten, etwa vier Wochen alten BN-Tiere mit AE in einem Northern Blot mit den MV-spezifischen Proben dargestellt. Es handelte sich hierbei um Tiere mit kurzen Inkubationszeiten (9 Tage nach intrazerebraler Inokulation). Das Expressionsmuster der virusspezifischen mRNAs glich dem, das bereits für die Lewis-Ratten mit AE und SAME beschrieben wurde: Die ersten drei Strukturgene N, P und M wurden in hohen Raten transkribiert, während auch in den akut erkrankten BN-Tieren die mRNAs für die beiden Glykoproteine nur in reduzierten Konzentrationen vorhanden waren. Auf transkriptioneller Ebene fanden sich zwischen beiden Rattenstämmen während der akuten Erkrankung keine Unterschiede in der Expression der MV-Strukturgene.

Abb. 25
Northern Blot Analyse von +pA-RNAs aus den Gehirnen zweier
BN-Ratten mit AE



RNAs aus den Gehirnen von zwei BN-Ratten mit AE wurden 9 Tage nach der Infektion isoliert, +pA-selektiert und Northern Blots angefertigt. Die Konzentration der RNA auf den Blots betrug 10 ug +pA-RNA pro 3 cm Kammbreite. Einzelne Streifen der Blots wurden mit jeweils einer für die mRNA eines Strukturgens spezifischen, ^{32}P -markierten RNA-Probe hybridisiert. Die einzelnen Streifen wurden nach der Hybridisierung der Genordnung des MV folgend montiert (Abb. 1a) und 2 Stunden bei RT autoradiographiert. Die Position der mono- (▷) und polycistronischen (▷) Transkripte ist markiert.

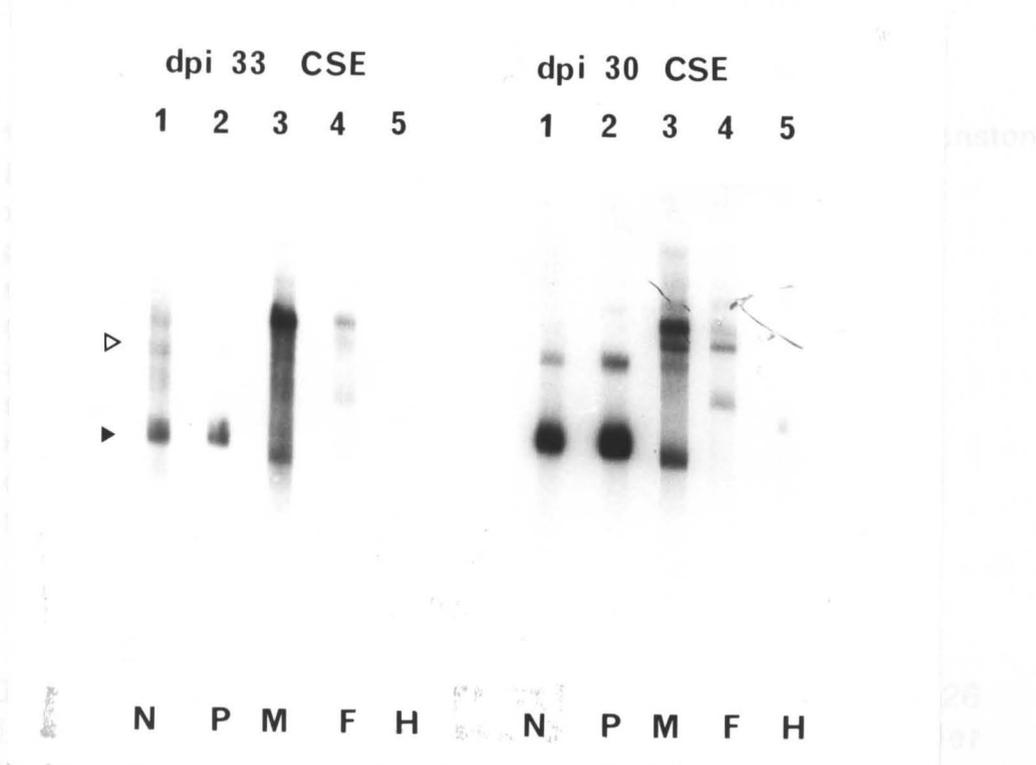
4. 4. 1. 2. Expression des MV-Genoms in BN-Tieren mit CSE

BN-Tiere, die keine akute Enzephalitis entwickelten, blieben klinisch gesund. Histologisch zeigten etwa 30% dieser klinisch gesunden Tiere eine CSE mit charakteristischer Histopathologie und nachweisbaren viralen Antigenen im Gehirn (Tab. 1, 2). RNAs aus den Gehirnen von BN-Ratten wurden etwa 30 Tage nach der Infektion isoliert und zunächst durch die Hybridisierung mit einer N-spezifischen Probe auf die Gegenwart viraler Sequenzen untersucht. Dabei ergab sich, daß in 4 von 10 BN-Tieren mit CSE MV-spezifische RNA nachweisbar war. Diese RNAs wurden +pA-selektiert und im Northern Blot auf die MV-spezifische Genexpression untersucht (Abb. 26). Wie für die AE-Tiere gezeigt, wurden auch in den aus den Gehirnen von BN-Ratten mit CSE isolierten +pA-RNAs die monocistronischen mRNAs für N und P in annähernd gleicher Konzentration transkribiert (siehe auch die quantitative Darstellung in Abb. 27). Für die anderen monocistronischen mRNAs, für M, F und H ergab sich ein von der SAME der Lewis-Ratten unterschiedliches Expressionsmuster: nicht nur die mRNAs der Glykoproteine waren reduziert oder fast nicht nachweisbar, sondern auch die monocistronische mRNA für das M-Gen wurde sehr ineffizient transkribiert.

Dies ist an den beiden in Abb. 26 dargestellten +pA-RNAs exemplarisch für alle weiteren untersuchten RNAs aus BN-Ratten mit CSE gezeigt.

Abb. 26

Northern Blot Analyse von +pA-RNAs aus den Gehirnen von BN-Ratten mit CSE



Aus den Gehirnen von zwei BN-Ratten, die histologisch das Bild einer CSE zeigten, wurden die RNAs extrahiert, +pA-selektiert und Northern Blots angefertigt. Die Konzentration der RNA auf den Blots betrug 10 ug +pA-RNA/3 cm Kammbreite. Nach der Hybridisierung mit ³²P-CTP-markierten RNA-Proben, die komplementär zur mRNA je eines Strukturgens waren, wurden die einzelnen Hybridisierungstreifen der MV-Genordnung folgend montiert und 2 Stunden bei RT autoradiographiert.

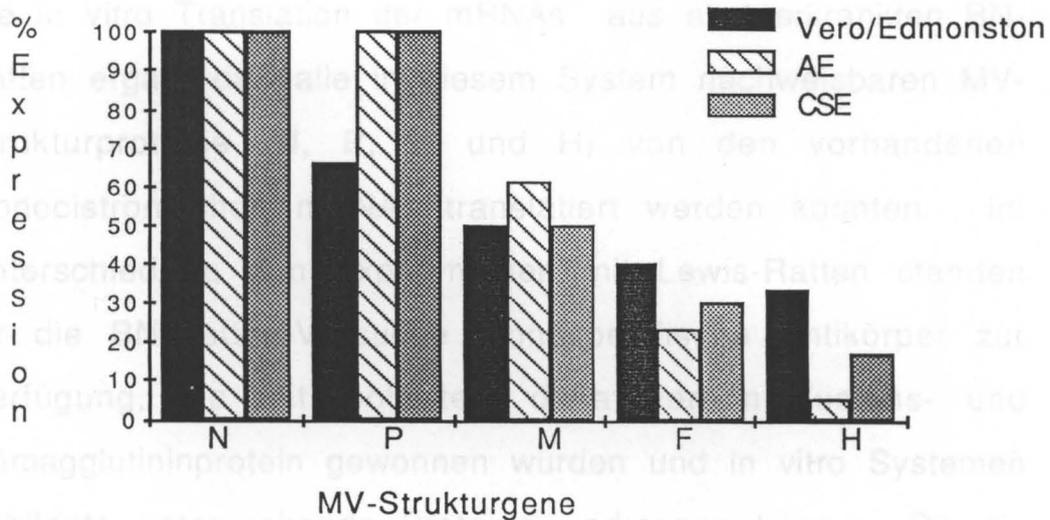
Die Position der mono- (▶) und polycistronischen (▷) +pA-RNAs ist markiert.

Die Expression des MV in den BN-Tieren in der persistierenden Infektion setzte in den BN-Tieren in der persistierenden Infektion bereits nach dem P-Gen ein. Relativ stabil hingegen war die Transkription der bicistronischen +pA-RNAs, vor allem an der MF-intercistronischen Region.

Der Expressionsgradient des MV in den Gehirnen der BN-Ratten mit CSE ist in Abb. 27 quantifiziert dargestellt, wie dies für die Lewis-Ratten beschrieben wurde.

Abb. 27

Quantitative Analyse der MV-Genexpression in den Gehirnen von BN-Ratten mit AE und CSE



Die MV-spezifischen Banden aus den in Abb. 25 und 26 dargestellten Northern Blots wurden nach der Autoradiographie aus den Nitrozellulosestreifen ausgeschnitten und im Szintillationszähler gezählt. Die für die einzelnen Strukturgene erhaltenen absoluten Zählerwerte wurden relativ zu der jeweiligen Expressionsrate der N-mRNA (N = 100%) berechnet. In dem Blockhistogramm sind die Expressionsdaten jeweils gemittelt für zwei BN-Ratten mit AE, drei BN-Ratten mit CSE und einer Vergleichs-RNA aus lytisch infizierter Gewebekultur dargestellt.

Die Restriktion der Genexpression auf transkriptioneller Ebene setzte in den BN-Tieren in der persistierenden Infektion bereits nach dem P-Gen ein. Relativ stabil hingegen war die Transkription der biscistronischen +pA-RNAs, vor allem an der MF-intercistronischen Region.

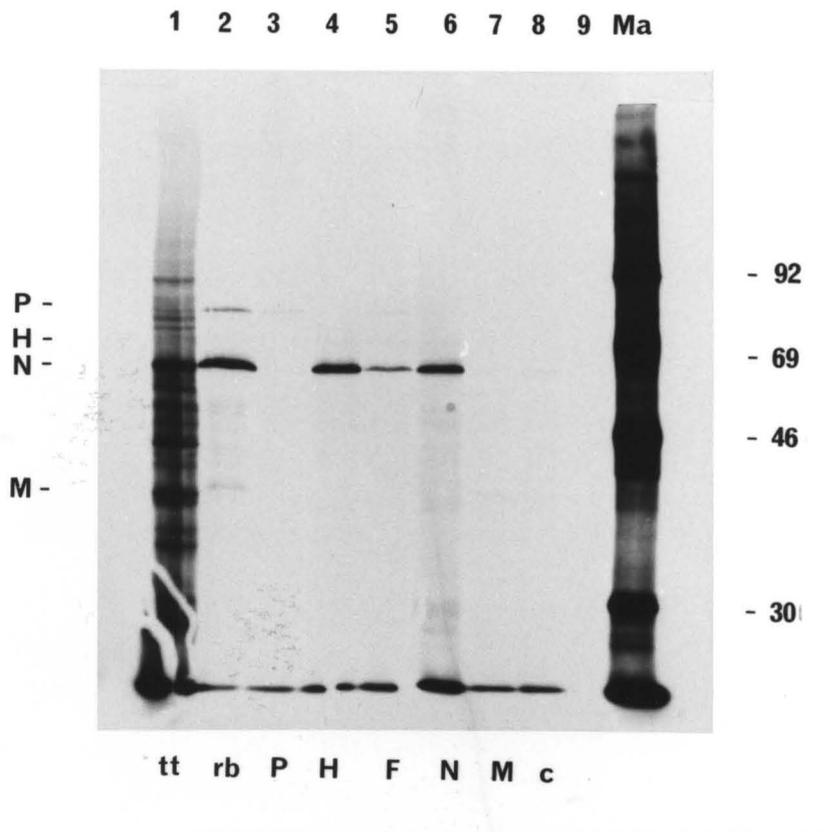
Der Expressionsgradient des MV in den Gehirnen der BN-Ratten mit CSE ist in Abb. 27 quantifiziert dargestellt, wie dies für die Lewis-Ratten beschrieben wurde.

4. 4. 2. In vitro Translation der mRNAs aus Gehirnen von BN-Ratten mit AE und CSE

Die in vitro Translation der mRNAs aus akut erkrankten BN-Ratten ergab, daß alle in diesem System nachweisbaren MV-Strukturproteine (N, P, M und H) von den vorhandenen monocistronischen mRNAs translatiert werden konnten. Im Unterschied zu den Experimenten mit Lewis-Ratten standen für die BN-Ratten-Versuche monospezifische Antikörper zur Verfügung, die mit isoliertem denaturiertem Fusions- und Hämagglutininprotein gewonnen wurden und in vitro Systemen gebildete entsprechende Proteine erkennen können. Da die Antigenpräparationen jedoch nicht ganz rein waren, präzipitierten beide monospezifische Antiseren neben ihren spezifischen Banden auch Nukleokapsidprotein wie Abb. 28 dokumentiert. Hier sind exemplarisch für ein BN-Tier mit AE (dpi 11) die in vitro Translationsprodukte dargestellt. Die gesamten Translationsprodukte (Spur 1, tt) wurden zunächst mit einem Hyperimmunserum (Spur 2, rb) und, im gleichen Experiment, mit einer Serie von monospezifischen Antikörpern gegen die einzelnen viralen Strukturproteine (in den Spuren 3-7) präzipitiert. Mit dem Hyperimmunserum ergaben sich Banden für N, P und M.

Abb. 28

In vitro Translation der +pA-RNA aus dem Gehirn einer BN-Ratte mit AE



+pA aus dem Gehirn einer BN-Ratte mit AE (dpi 11) wurde in einem Kaninchen-Retikulozyten-Lysat in Gegenwart von ^{35}S -Methionin in vitro translatiert. Aliquots der totalen Translationsprodukte wurden entweder direkt auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel analysiert (Spur 1) oder mit Kaninchen-Hyperimmunserum (Spur 2) oder monospezifischen Antiseren gegen die einzelnen Strukturproteine (Spur 3: P, Spur 4: H, Spur 5: F, Spur 6: N, Spur 7: M) immunpräzipitiert. In Spur 9 ist als Kontrolle die Inkubation des totalen Translats ohne MV-Antikörper aufgetragen. Als Größenstandard sind ^{14}C -markierte Markerproteine aufgetragen (Ma).

Die monospezifischen Antikörper reagierten in diesem Experiment nur sehr schlecht mit den in vitro Translationsprodukten, insbesondere die Antikörper gegen H- und F-Protein. Die H-spezifische Bande war im Autoradiogramm nur sehr schwach zu sehen und konnte in der Abb. 28 nicht dargestellt werden.

Die mRNAs, die aus den Gehirnen von CSE-Tieren isoliert und in vitro translatiert wurden, zeigten sowohl mit Hyperimmunserum als auch mit monoklonalen Antikörpern ausschließlich Translationsprodukte für die beiden stark exprimierten mRNAs des N- und P- Gens. Ein Translationsprodukt der in geringen Konzentrationen vorhandenen M mRNA ließ sich in allen untersuchten RNAs ebensowenig nachweisen wie Translationsprodukte der gp mRNAs.

Eine Zusammenfassung der Daten über die biologische Aktivität der mRNAs aus BN-Tieren mit AE und CSE ist in Tab. 5 dargestellt.

Tab. 5
In vitro Translation von mRNAs aus BN-Ratten mit AE und CSE

Erkrankungsbild	Strukturproteine			
	N	P	M	H
AE (n = 9)	+	+	+	(-)
CSE (n = 6)	+	+	-	(-)

1 µg +pA-RNA aus den Gehirnen von je 9 BN-Ratten (n = 9) mit AE und 6 mit CSE (n = 6) wurde in vitro translatiert und mit Kaninchen-anti-MV-Hyperimmunserum immunpräzipitiert. + bzw. - bezeichnen die in vitro nachweisbare Expression des jeweiligen Strukturproteins, (-) bedeutet den fehlenden Nachweis des Proteins durch in vitro Translation ohne anschließende Immunpräzipitation.

4. 5. Untersuchungen über die pathogenetische Rolle des Immunsystems bei der Etablierung einer persistierenden Infektion im ZNS

Antivirale Antikörper können, wie in Gewebekultur-experimenten gezeigt wurde, einen regulatorischen Einfluß auf die intrazelluläre MV-Replikation ausüben (Fujinami et al., 1979, 1980, Barrett et al., 1985). Die Analyse der MV-spezifischen Genexpression in den beiden klinisch unterschiedlichen persistierenden ZNS-Infektionen bei Lewis- und BN-Ratten (SAME und CSE) ergab, daß die

Expression der MV-Strukturgene jeweils in verschiedener Weise transkriptionell restringiert war. Da sich die beiden Ratteninzuchtstämme immungenetisch voneinander unterscheiden und ihre humorale Immunreaktion gegen das MV (Tab. 3) deutlich unterschiedlich sind, schien eine Immunpathogenese bei der Etablierung der ZNS-Infektion denkbar. Aus diesem Grunde wurde die MV-Genexpression vor dem Hintergrund der humoralen Immunreaktion dieser beiden Rattenstämme untersucht und in einem weiteren Versuchsansatz der Einfluß applizierter antiviraler Antikörper auf die Expression der MV-Strukturgene im ZNS untersucht.

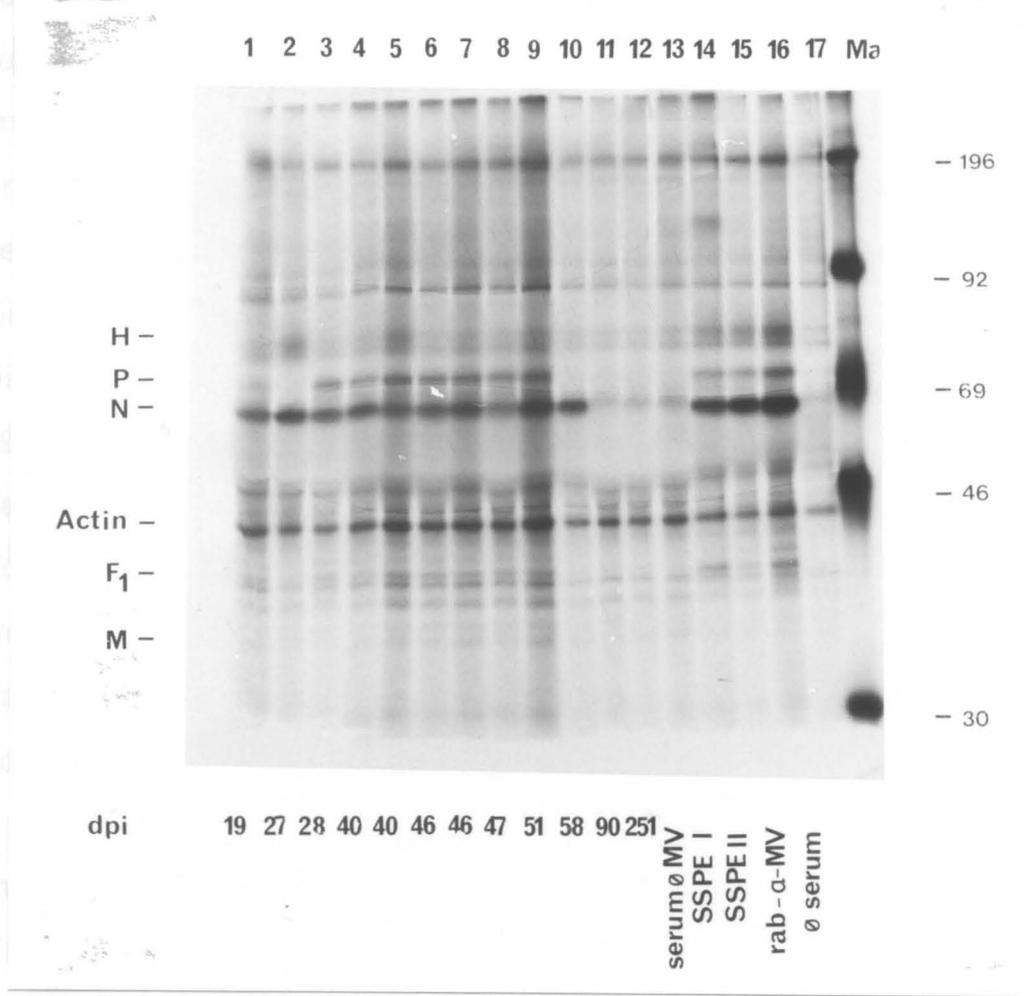
4. 5. 1. Humorale Immunreaktion gegen MV-Strukturproteine in Serum und Liquor von Lewis-Ratten

In Serum- und Liquorproben von Lewis-Ratten mit AE und SAME wurde die humorale Immunreaktion gegen die Strukturproteine des MV mittels Immunpräzipitation untersucht. Hierfür wurden ^{35}S -markierte Proteine aus dem Lysat infizierter Verozellen mit Seren und Liquores von akut und subakut erkrankten Tieren immunpräzipitiert und anschließend über ein Polyacrylamidgel aufgetrennt. Diese Methode erlaubt es, die gegen die MV-Strukturproteine gebildeten Antikörper spezifisch für jedes einzelne virale Protein nachzuweisen und unterscheidet sich somit von Nachweismethoden wie Elisa-Assays oder Neutralisationstests, deren Ergebnisse in Tab. 3 wiedergegeben sind.

Da in den Seren von Lewis-Ratten mit AE noch keine masernspezifischen Antikörper nachweisbar waren, wurden entsprechende Untersuchungen zur Darstellung der humoralen Immunreaktion gegen die MV-Strukturproteine an Serum- und Liquorproben von Lewis-Ratten mit SAME vorgenommen.

Lewis-Ratten mit SAME weisen spezifische Antikörper auf (Tab. 3, 6). Abb. 29 zeigt das Autoradiogramm der Immunpräzipitation der Seren von zwölf Lewis-Ratten mit SAME (Spur 1 - 12) zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der Inokulation mit dem Virus. Als positive Kontrollen sind in den Spuren 14 - 16 die Immunpräzipitationen der Seren zweier SSPE-Patienten (SSPE I und SSPE II) und eines Kaninchen-anti-MV-Hyperimmunserums aufgetragen, in denen die nachweisbaren Antikörperreaktionen gegen die MV-Strukturproteine erkennbar sind. In einem Größenbereich von etwa 80 K erscheint eine H-spezifische Bande, die aufgrund der unterschiedlichen Glykosylierungsstufen dieses Proteins unscharf ist. Es folgen, der Größe nach, die P- und die N-spezifische Bande, welche in allen Fällen als stärkstes Signal zu sehen ist. Aktin, als Bestandteil des Viruspartikels, ist in einem Größenbereich von etwa 45 K nachweisbar. Sehr schwach ist das F₁-spezifische Signal (40 K) erkennbar, während eine M-spezifische Bande nicht eindeutig zu sehen ist.

Abb. 29
Immunreaktion gegen MV im Serum von Lewis-Ratten mit
SAME



MV-spezifische Proteine aus ³⁵S-Methionin markierten Zell-Lysaten wurden mit Seren von Lewis-Ratten inkubiert und die Präzipitationsprodukte auf einem 10% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. In den Spuren 1 - 12 sind die MV-spezifischen Präzipitate von Seren aus SAME-Tieren mit unterschiedlichen Inkubationszeiten (dpi 19 - 251) nach der Infektion aufgetragen. Als Serumkontrolle ist in Spur 13 das Serum einer nicht infizierten Lewis-Ratte aufgetragen. Als positive Kontrollen (Spur 14 und 15) dienten Seren zweier SSPE-Patienten sowie ein Kaninchen-anti-MV-Hyperimmunserum (Spur 16). Das Lysat ohne Serumbehandlung ist in der Spur 17 dargestellt. Als nachweisbare Proteine sind, der Größe nach, H, P, N, Aktin, F₁ und M zu sehen. In Spur "Ma" sind als Größenstandard ¹⁴C-markierte Markerproteine aufgetragen.

Zur Darstellung des unspezifischen Hintergrundes, der z. B. durch die verwendete Lysat-Präparation oder kopräzipitierte zelluläre Proteine bedingt sein kann, sind in der Spur 17 die Immunpräzipitation des Lysats ohne Zugabe von Serum und in Spur 13 die des Lysats nach Inkubation mit dem Serum einer gesunden, nicht infizierten Lewis-Ratte gleichen Alters wie die Tiere mit SAME aufgetragen.

Die Präzipitation der Seren der Lewis-Ratten mit SAME (dpi 19 - 251) ergab, daß die Tiere bis einschließlich 58 Tage nach der Inokulation eine deutliche humorale Immunreaktion in Form antiviraler Antikörper gegen MV-Strukturproteine aufweisen, die sich im wesentlichen gegen das N-, P-, F₁- und das H-Protein richtet. Eine M-spezifische Bande ist nur sehr schwer nachweisbar, könnte jedoch in den Spuren 5 - 9 (dpi 40 - 51) aufgrund der Position im Gel vermutet werden.

In den untersuchten Liquores von Tieren mit SAME war, wie in Tab. 6 zusammengefaßt dargestellt, die gleiche MV-spezifische Antikörperreaktion wie in den entsprechenden Serumproben nachweisbar. Eine M-spezifische Bande war hier jedoch in keinem Falle zu erkennen.

4. 5. 2. Charakterisierung der humoralen Immunreaktion gegen MV in Serum und Liquor von BN-Ratten

In Analogie zu den Antikörperbestimmungen bei erkrankten Lewis-Ratten wurden Serum- und Liquorproben von BN-Tieren mit AE und CSE immunpräzipitiert (Abb. 30, 31).

Tab. 6
Humorale antivirale Immunreaktion in Serum- und Liquorproben von Lewis-Ratten mit SAME

	anti-N	anti-P	anti-M	anti-F	anti-H
Serum (n = 8)	+	+	(+)	+	(+)
Liquor (n = 8)	+	+	-	+	(+)

Die Tabelle faßt die Antikörperreaktionen in Serum- und Liquorproben von acht subakut erkrankten Lewis-Ratten mit SAME zusammen. Das markierte Zell-Lysat aus mit CAM/RBH-Virus infizierten Verozellen wurde immunpräzipitiert und die Produkte auf einem 10%igen SDS-haltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt. + bedeutet eine deutlich nachweisbare, (+) eine nur sehr schwach erkennbare, - keine sichtbare Antikörperreaktion gegen das jeweilige Strukturprotein.

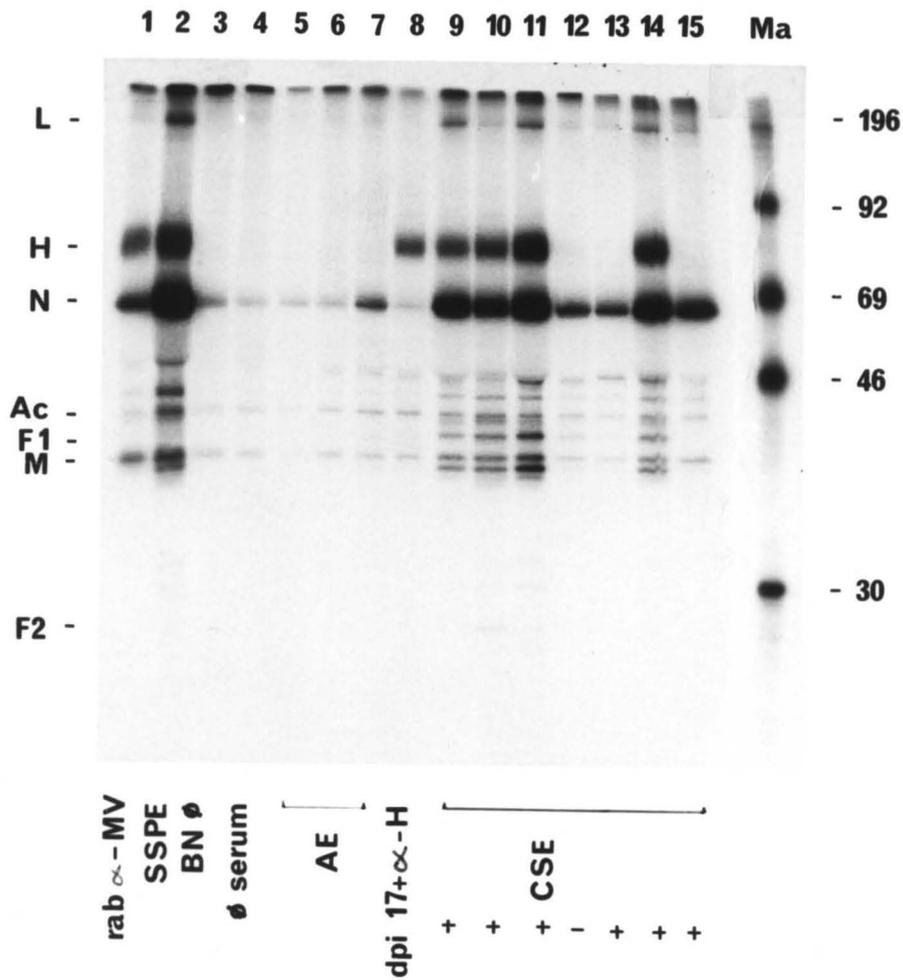
In Abb. 30 sind die Ergebnisse für die Seren der BN-Tiere mit AE und CSE dargestellt. Als positive Kontrollseren dienen ein Kanichen-Hyperimmunserum (Spur 1) und das Serum eines SSPE-Patienten (Spur 2). Deutlich erkennbar sind die Signale gegen die einzelnen MV-Strukturproteine: bei 196 K gegen L-Protein (Spur 2), eine starke Reaktion gegen H- und N-Protein, weniger ausgeprägte Reaktion gegen Aktin, F₁- und M-Protein. Ein sehr schwaches Signal für F₂-spezifische Antikörper war in der Autoradiographie in den Kontrollspuren erkennbar, ließ sich jedoch in der Abbildung nicht darstellen. Ebenfalls nicht

darstellbar waren in diesem Experiment die P-spezifische Antikörperpräzipitation, da aufgrund der gewählten Polyacrylamidkonzentration im Gel (12,5%) die H- und P-spezifischen Banden nicht aufgetrennt werden konnten.

Als Negativkontrollen sind in den Spuren 3 und 4 die Immunpräzipitationen einer nicht infizierten BN-Ratte und des Lysats ohne Serumzugabe aufgetragen. Es erscheinen schwache Banden in Höhe des MV-N-Proteins, des Aktins und des M-Proteins.

Die Spuren 5 - 7 zeigen die Präzipitationen der Seren von BN-Ratten mit AE (dpi 9 -11). Erkrankte Tiere weisen im allgemeinen keine Antikörper gegen MV-Strukturproteine auf. Eine Ausnahme bildet das Serum in Spur 7, das eine N-spezifische Bande präzipitiert. In den Spuren 9 - 15 sind die Immunpräzipitationen der Seren von BN-Ratten mit CSE aufgetragen. Die histopathologische Manifestation der Erkrankung ist mit + oder - angegeben. In allen Fällen ist eine Antikörperreaktion gegen das N-Protein zu sehen, während nur vier der insgesamt sieben Tiere eine ausgeprägte Immunreaktion gegen die anderen viralen Strukturproteine (H, F₁ und M) aufweisen. An der Position des M-spezifischen Signals erscheinen in den persistierenden Infektionen (CSE der BN-Ratten und SSPE) Doppelbanden, die im Hyperimmunserum (Spur 1) nicht nachweisbar sind. In Spur 8 ist die Immunpräzipitation des Serums einer mit neutralisierenden anti-H-Antikörpern behandelten, neugeborenen Lewis-Ratte (siehe 4. 8.) aufgetragen.

Abb. 30
 Immunreaktion gegen MV im Serum von BN-Ratten mit AE und CSE



MV-spezifische Proteine aus 35 S-markiertem Zell-Lysat aus Edmonston-Virus infizierten Verozellen wurden mit den auf MV-spezifische Antikörper zu testenden Seren inkubiert und die Produkte der Immunpräzipitation wurden anschließend auf einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als positive Kontrollen wurden Hyperimmunserum (rab-anti-MV, Spur 1) und SSPE-Serum (Spur 2) verwendet, Spur 3 und 4 zeigen die Negativkontrollen (BN-Ratte ohne MV, Lysat ohne Serum). BN-Ratten mit AE mit einer Inkubationszeit von 9, 10 und 11 Tagen sind in den Spuren 5 - 7 aufgetragen. Spur 8 zeigt das Serum einer antikörperbehandelten Lewis-Ratte (dpi 17). In den Spuren 9 - 15 sind die Seren von BN-Ratten mit CSE aufgetragen. Die histologische Manifestation einer CSE ist jeweils mit + oder - angegeben. Als nachweisbare MV-Strukturproteine sind - der Größe nach - L, H, N, Aktin, F1, M und F2 zu sehen. Als Größenstandard sind in der letzten Spur 14 C-markierte Markerproteine aufgetragen (Ma).

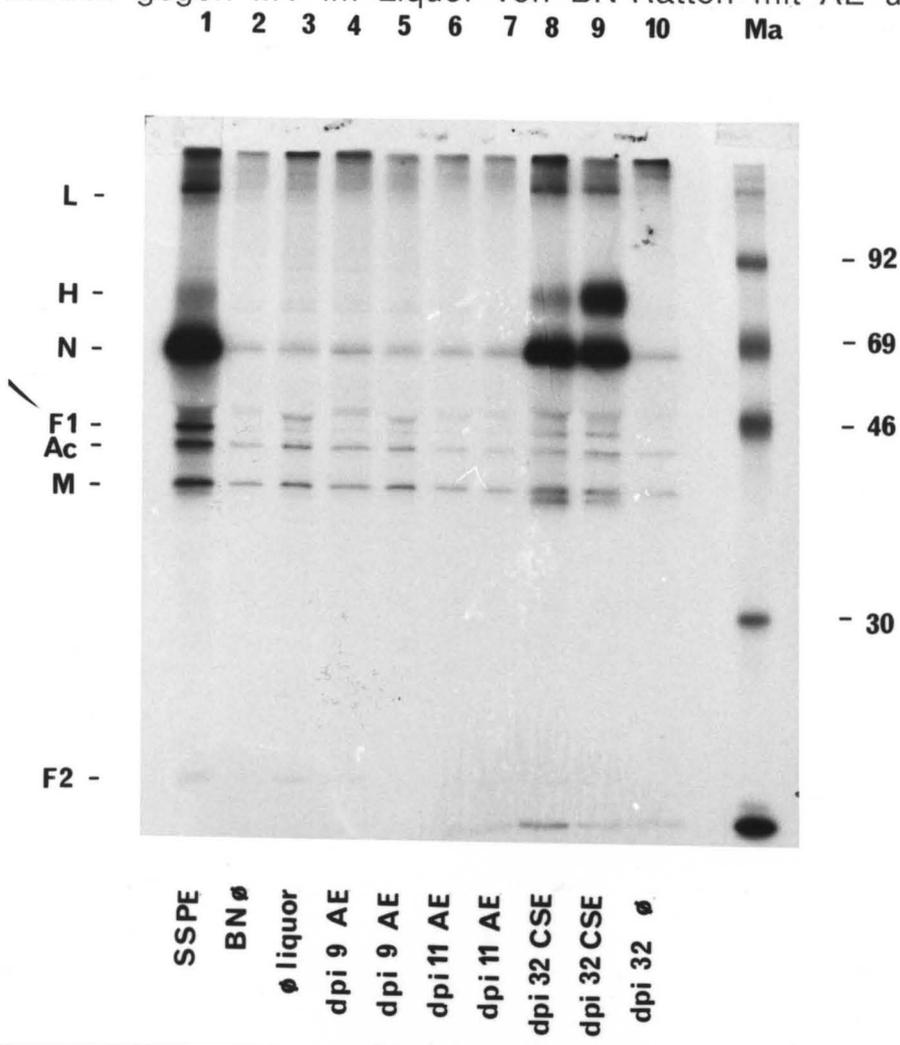
Man erkennt, daß noch keine N-spezifischen Antikörper gebildet werden, während eine starke, den CSE-Seren ähnliche Immunreaktion gegen das H-Protein vorhanden ist.

Die Immunpräzipitationen der Liquores von BN-Ratten mit AE und CSE sind in Abb. 31 dargestellt. In der Positivkontrolle (Spur 1, SSPE-Liquor) erscheinen die für Abb. 30 beschriebenen MV-spezifischen Signale, als Negativkontrollen sind hier die Liquores von nicht infizierten BN-Ratten (Spur 2) gleichen Alters wie die Tiere mit AE und gleichen Alters wie die Tiere mit CSE (Spur 10) aufgetragen. Im wesentlichen weisen die Liquores der untersuchten BN-Tiere dieselben Antikörperreaktionen gegen MV auf wie die entsprechenden Seren. Tabellarisch sind die Daten in Tab. 7 zusammengefaßt dargestellt. Auffällig ist auch hier die Doppelbande in Höhe des M-spezifischen Signals in den Liquorproben von BN-Ratten mit CSE.

Durch diese Experimente wurden die mit immunologischen Methoden erhaltenen Daten bestätigt, nach denen in Serum und Liquor von BN-Ratten mit CSE - im Gegensatz zu den Lewis-Ratten mit SAME - eine weit effizientere humorale Immunreaktion gegen die MV-Strukturproteine stattfindet

Abb. 31

Immunreaktion gegen MV im Liquor von BN-Ratten mit AE und CSE



Liquorproben von BN-Tieren wurden mit ^{35}S -markiertem Zell-Lysat aus lytisch mit Edmonston-Virus infizierten Verozellen immunpräzipitiert und die Produkte auf einem 12,5% SDS-Polyacrylamidgel aufgetrennt. Als Kontrollen sind die Liquores eines SSPE-Patienten (Spur 1), einer gesunden BN-Ratte (Spur 2) und das Lysat ohne Liquor (Spur 3) aufgetragen. Die Spuren 4 - 7 zeigen die Präzipitationen der Liquores von BN-Ratten mit AE 9 bzw. 11 Tage nach der Infektion, die Spuren 8 und 9 die Antikörperreaktion in den Liquorproben zweier BN-Ratten mit CSE. In Spur 10 ist die Präzipitation des Liquors eines BN-Ratte (dpi 32) aufgetragen, in deren Gehirn immunhistologisch keine MV-spezifischen Antigene nachgewiesen werden konnten. Als Größenstandard sind ^{14}C -markierte Markerproteine aufgetragen (Ma).

Tab. 7

Zusammenfassung der Daten zur humoralen antiviralen Immunreaktion gegen MV-Strukturproteine in Serum- und Liquorproben von BN-Ratten mit AE und CSE

Erkrankungsbild	anti-N	anti-P	anti-M	anti-F	anti-H
Serum AE (n = 4) dpi 9 - 11	(+)	-	-	-	-
CSE (n = 6) dpi 32 - 39	+	(-)	+	+	+
Liquor AE (n = 4) dpi 9 - 11	-	-	-	-	-
CSE (n = 6) dpi 32 - 39	+	(+)	-	+	+

Die Tabelle dokumentiert eine Zusammenfassung der gegen die MV-Strukturproteine gerichteten humoralen Immunreaktion in Serum- und Liquorproben von BN-Ratten mit AE und CSE. Aus dem markierten Lysat aus CAM-Virus infizierten Verozellen wurden die jeweiligen Strukturproteine immunpräzipitiert und über ein 12,5%iges, SDS-haltiges Polyacryamidgel aufgetrennt. Die P-spezifische Reaktion ist in Klammern vermerkt, da aufgrund der gewählten Auftrennungsbedingungen diese Bande von der H-spezifischen nicht zu unterscheiden war und somit in dem Experiment (Abb. 30, 31) nicht darstellbar war. Der Nachweis P-spezifischer Antikörper konnte jedoch in einem anderen Experiment geführt werden. dpi gibt den Zeitraum nach Inokulation mit CAM-Virus an, n die Anzahl der analysierten Serum- und Liquorproben.

4. 5. 3. "Antikörper-induzierte MV-Persistenz" in neugeborenen Lewis-Ratten

Neugeborene Lewis-Ratten verstarben nach der intrazerebralen Inokulation mit CAM-Virus innerhalb von 4 - 6 Tagen an einer akuten Enzephalitis (Tab. 1). Zirkulierende antivirale Antikörper konnten in diesen Tieren nicht nachgewiesen werden. Daher erschienen Tiere dieser Altersgruppe geeignet, den Einfluß einer passiven Immunisierung auf die intrazelluläre Virusreplikation im Gehirn zu untersuchen. 24 Stunden nach der Infektion wurden 10 Versuchstieren virusneutralisierende monoklonale Antikörper intraperitoneal injiziert (50 µl Ascites mit einem Titer von 1 : 200 000 HHT/ml). Eine Kontrollgruppe wurde nur mit Virus infiziert.

Bereits am Verlauf der Erkrankung zeigte sich, daß die Inkubationszeit unter dem Einfluß der neutralisierenden Antikörper deutlich verlängert war. Während die Tiere der Kontrollgruppe innerhalb von sechs Tagen nach der Infektion an einer akuten Enzephalitis verstarben, überlebten die Antikörper-behandelten Tiere bis zu drei Wochen nach der Infektion.

RNAs wurden aus den Gehirnen beider Versuchstiergruppen isoliert und auf mögliche Veränderungen viraler Genexpression untersucht.

Die Northern Blot Analysen der +pA-RNAs aus den Gehirnen zweier Antikörper-behandelter und einer Kontrollratte, die nur mit Virus inokuliert worden war, sind in Abb. 32 dargestellt. Das Kontrolltier (Abb. 32a) zeigt das gleiche

Expressionsmuster der viralen mRNAs, das für die akut erkrankten älteren Lewis-Ratten bereits beschrieben wurde: Die mRNAs des N-, P- und M-Gens wurden in hohem Maße exprimiert, während die mRNAs für die beiden Glykoproteine F und H in geringeren Mengen nachweisbar waren. Die beiden aus Antikörper-behandelten Tieren extrahierten RNAs zeigten, abhängig vom Zeitpunkt nach der Infektion, ein verändertes Expressionsmuster. Bereits 10 Tage nach der Infektion kam es in Gegenwart von neutralisierenden Antikörpern zu einer Restriktion der Transkription des M-Gens (Abb. 32b) und die Glykoprotein-mRNAs waren stärker reduziert als im Kontrolltier. Am 17. Tag nach der Infektion waren die monocistronischen Transkripte für M, F und H nur noch in sehr geringen Mengen nachweisbar (Abb. 32c). Die bicistronischen Transkripte waren von der Restriktion der Transkription nicht in demselben Maße betroffen.

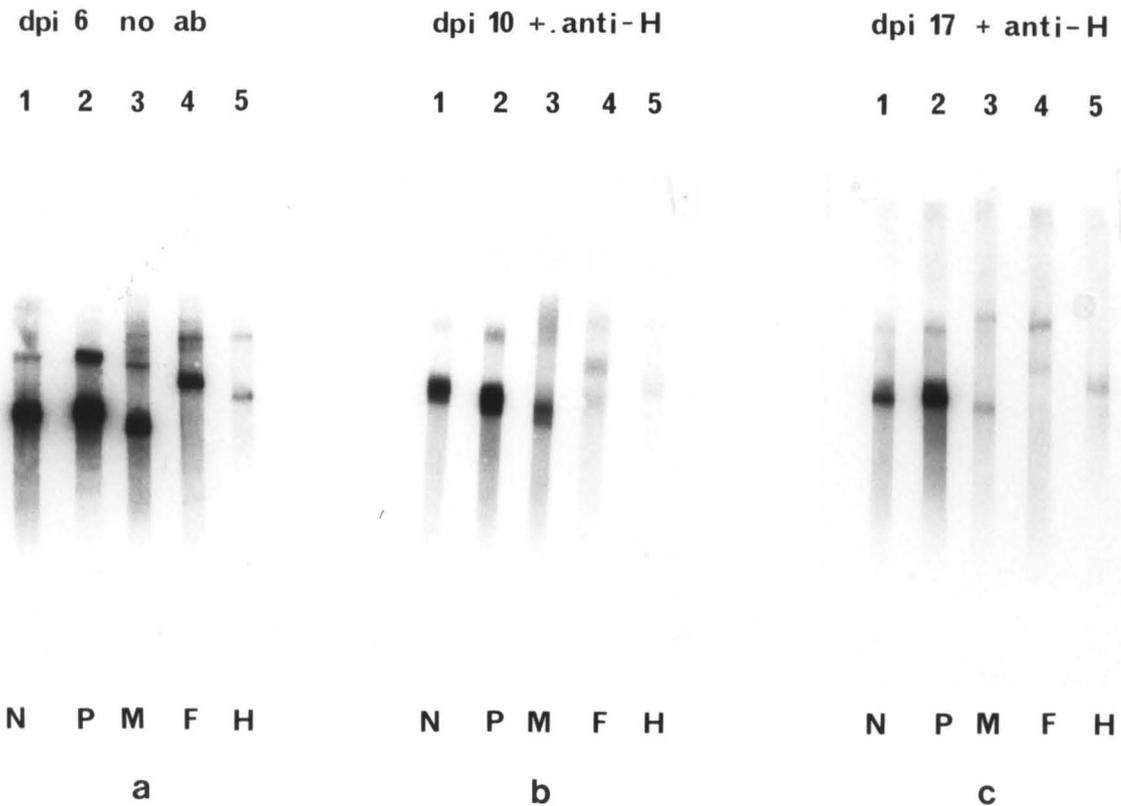
Auf transkriptioneller Ebene glich die MV-Genexpression in neugeborenen, Antikörper-behandelten Lewis-Ratten der der älteren BN-Ratten mit CSE mit starker humoraler antiviraler Immunreaktion.

4. 5. 4. In vitro Translation der +pA-RNAs aus den Gehirnen von Antikörper-behandelten und unbehandelten, virusinfizierten neugeborenen Lewis-Ratten

Die mRNAs der Antikörper-behandelten Tiere und der nicht-behandelten Kontrolltiere wurden durch in vitro Translationsexperimente auf ihre biologische Aktivität überprüft.

Abb. 32

Northern Blot Analysen der +pA-RNAs aus Gehirnen von Antikörper-behandelten neugeborenen Lewis-Ratten mit AE



RNAs wurden aus den Gehirnen eines Kontrolltiers mit AE (dpi 6 no ab) und zweier Tiere (dpi 10, dpi 17), die intraperitoneal neutralisierende anti-H-Antikörper erhalten hatten, isoliert. Die RNAs wurden +pA-selektiert und im Northern Blot auf MV-spezifische Expression analysiert. Die Konzentration der RNAs betrug 10 ug/3 cm +pA-RNA. Als Hybridisierungsproben wurden ³²P-CTP-markierte RNA-Proben komplementär zu den mRNAs der einzelnen Strukturgene verwendet. Die Expositionsdauer betrug 6 Stunden.

mittels Immunpräzipitation mit einem Kaninchen-anti-MV-Hyperimmunserum von den zellulären Proteinen abgetrennt und über ein Gel analysiert. Ein F-spezifisches Translationsprodukt konnte aufgrund fehlender monospezifischer Antiseren nicht dargestellt werden.

Die Ergebnisse sind in Tab. 8 dargestellt. In den Kontrolltieren wurden dieselben Translationsprodukte immunpräzipitiert, wie sie für die akut erkrankten Lewis-Ratten beschrieben wurden, nämlich N, P und M. Die in vitro translatierten mRNAs aus den Gehirnen der Antikörper-behandelten Tiere ergab fast ausschließlich N- und P-spezifische Signale, in geringer Konzentration ließ sich jedoch bis zu 9 Tagen nach der Antikörper-Behandlung ein schwaches M-spezifisches Signal nachweisen (Tab. 8).

Tab. 8

In vitro Translationsprodukte der +pA-RNAs aus den Gehirnen von MV-infizierten -Antikörperbehandelten und unbehandelten neugeborenen Lewis-Ratten

		unbehandelte Ratte		Antikörperbehandelte Ratten			
	dpi	6	6	9	10	11	17
N		+	+	+	+	+	+
P		+	+	+	+	+	+
M		+	+	-	-	-	-
H		+	+	-	-	-	-

+pA-RNAs aus den Gehirnen von neugeborenen mit Anti-H-Antikörpern behandelten Lewis-Ratten und eines nicht behandelten Kontrolltiers wurden in einem zellfreien in vitro Translationssystem in Gegenwart von ^{35}S -Methionin translatiert. Die erhaltenen Proteine wurden entweder direkt auf einem 10%igen, SDS-haltigen Polyacrylamidgel aufgetrennt oder mittels Immunpräzipitation mit einem Kaninchen-anti-MV-Hyperimmunserum von den zellulären Proteinen abgetrennt und über ein Gel analysiert. Ein F-spezifisches Translationsprodukt konnte aufgrund fehlender monospezifischer Antiseren nicht dargestellt werden.

5. Diskussion

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war es, mit molekularbiologischen Methoden die akute und die persistierende Masernvirusinfektion des Zentralnervensystems in zwei immungenetisch unterschiedlichen Ratten-Inzuchtstämmen zu charakterisieren. Die erhobenen Untersuchungsergebnisse lassen erkennen, daß, unabhängig vom verwendeten Rattenstamm und der Form der zentralnervösen Infektion die Masernvirusgenexpression im Gehirn auf transkriptioneller Ebene restringiert ist. Die monocistronischen mRNAs für das F- und vor allem für das H-Gen sind in allen untersuchten Typen der ZNS-Infektionen nur in geringen Konzentrationen vorhanden (Abb. 17, 18, 25, 26, 32). Dieser Effekt ist bei Lewis- wie auch bei BN-Ratten sowohl in der akuten als auch in der persistierenden Infektion nachweisbar. Darüber hinaus konnte vor dem Hintergrund der unterschiedlichen humoralen antiviralen Immunreaktion dieser Tiere gezeigt werden, daß virale Antikörper zur Etablierung und Aufrechterhaltung einer persistierenden Infektion beitragen.

Die Restriktion der Genexpression der Glykoproteine tritt in allen untersuchten Enzephalitis-Typen bereits sehr kurze Zeit nach der Infektion mit MV im ZNS beider Rattenstämme auf (Abb. 17, 25, 32). Der Vergleich mit den relativen Expressionsraten für die viralen mRNAs in lytisch infizierter Gewebekultur, der in Abb. 19, 20 und 27 dargestellt ist, verdeutlicht dies: Während in der lytischen Infektion die Expressionsrate für das F- bzw. das H-Gen noch 40% bzw. 30%

der des N-Gens beträgt, werden in den zentralnervösen Infektionen die gp-mRNAs nur noch in einer relativen Häufigkeit von etw 10% des N-Gens exprimiert. Diese Restriktion tritt unabhängig vom untersuchten Rattenstamm, vom Alter der infizierten Tiere und von der Inkubationszeit der Erkrankung auf. Außerdem ist sie unabhängig vom humoralen Immunstatus der Tiere, da sie in Tieren mit deutlich nachweisbarer Immunreaktion gegen das MV ebenso auftritt wie in Tieren, bei denen keine antiviralen Antikörper nachweisbar sind (Abb. 29, 30, 321 Tab. 3, 6, 7, Liebert und ter Meulen, 1987).

Diese Beobachtungen legen die Annahme nahe, daß spezifische Wirtszellfaktoren für die Restriktion der Transkription eine entscheidende Rolle spielen. Gehirnzellen stellen eine hochdifferenzierte Zellpopulation mit komplexen Zell-Zell-Interaktionen, einer sehr hohen metabolischen Aktivität und niedriger regenerativer Kapazität dar. Ein Zusammenhang zwischen dem Differenzierungs- und Aktivierungszustand neuronaler Zellen und der MV-Replikation wurde in Gewebekultur mit transformierten neuronalen Zellen nachgewiesen (Yoshikawa und Yamanouchi, 1984): Eine fortschreitende Differenzierung der Zellen durch einen experimentell induzierten erhöhten intrazellulären cAMP-Spiegel führt selektiv zu einer Restriktion der MV-Replikation. Diese Restriktion findet auf transkriptioneller Ebene statt, wobei die monocistronischen mRNAs der Strukturgene nicht mehr nachweisbar sind. Stabiler und damit länger nachweisbar sind die genomische RNA und polycistronische Transkripte. Für

eine wirtszellspezifische Restriktion der gp-mRNAs spricht außerdem die Tatsache, daß in permissiven Gewebekulturzellen die gp-mRNAs des aus AE-Gehirnen re-isolierten Virus mit der für die lytische Infektion typischen Expressionsrate transkribiert werden (Abb. 11).

Über die Mechanismen, die zu einer wirtszellspezifischen Restriktion in den infizierten Gehirnzellen führen könnten, kann nur spekuliert werden. Interessanterweise beginnt die Restriktion im F-Gen. Diesem Gen geht am 5' Ende eine lange, nichttranslatierte Region voraus, die aus dem M-Gen in das F-Gen hineinreicht (Richardson et al., 1986, Buckland et al., 1987) und die einen sehr hohen Cytosinegehalt hat (44%) (Buckland et al., 1987). Diese Sequenz, die als einziges Morbillivirus nur das MV besitzt, könnte für die Regulation der Expression des Gens eine Rolle spielen. Für zelluläre Gene konnte gezeigt werden, daß eine derartige C-reiche 5' - terminale Sequenz negativ regulatorisch auf die Translations-effizienz der Gens wirken kann (Hunt, 1985, Sap et al., 1986). Wenn dies auch für die entsprechende Sequenz des MV gilt, könnte dies die Immunfluoreszenzdaten erklären, nach denen F-Protein in den Gehirnen aller untersuchten Tiere stets in geringerer Menge exprimiert wird als H-Protein, obwohl aufgrund der RNA-Analysen mehr F- als H-mRNA vorhanden ist (Abb. 17, 18, 25, 26, 32, Liebert et al., 1986, Liebert und ter Meulen, 1987). Auf transkriptioneller Ebene wäre eine regulatorische Funktion dieser langen C-reichen Region ebenfalls denkbar, da eine Bindung von Proteinen oder komplementärer zellulärer RNAs (Sutcliffe et al., 1984) an diese intergenische Region stattfinden könnte, die spezifisch

in Gehirnzellen vorhanden sind und so die Transkription der nachfolgenden Gene attenuieren könnten. Eine solche Bindung könnte rein allosterisch die Transkription durch den Polymerasekomplex inhibieren oder zu Veränderungen in der Sekundärstruktur des viralen Genoms führen, die, wie Versuche mit photoreaktivem Psoralen mit isolierten RNP-Partikeln von VSV gezeigt haben, einen weiteren Mechanismus für die Inhibition viraler Transkription darstellen (Nakashima et al., 1979, Banerjee, 1987). Eine Erklärung für die geringen Konzentration von F- und H-mRNA könnte in einer erhöhten Instabilität dieser mRNAs liegen, die möglicherweise durch wirtszellspezifische Faktoren induziert wird.

Eine verminderte Affinität der viralen Polymerase zu den Initiationssequenzen dieser beiden mRNAs aufgrund von Sequenzmutationen oder Modifikationen am Polymerasekomplex selbst spielt wahrscheinlich keine Rolle für die spezifische Restriktion des F- und des H-Gens, da die Inkubationszeit für die Entstehung von Mutationen sehr kurz ist und die mRNAs für die N-, P- und M-Proteine mit hoher Effizienz transkribiert werden. Dies gilt zumindest für die AE und die SAME in Lewis Ratten. Untersuchungen der Expression der mRNA auf Einzelzellniveau durch in situ Hybridisierungsexperimente in den Gehirnen von akut und subakut erkrankten Lewis-Ratten zeigen, daß die Restriktion der gp-mRNAs nicht in allen Zellen gleichzeitig erfolgt. Die mRNAs der Strukturgene N, P und M werden in allen Zellen in etwa gleicher Weise exprimiert, hingegen werden in deutlich weniger Zellen nachweisbare Mengen F- und H-spezifischer mRNAs transkribiert. Diese

Zellen sind möglicherweise in der Lage, zumindest in der AE einen kompletten Replikationszyklus für das Virus aufrechtzuerhalten und infektiöse Viruspartikel, die in der AE reisolierbar sind, freizusetzen.

Unabhängig von der Bildung infektiöser Viruspartikel kann die Infektionsausbreitung im ZNS über den replikativen Komplex stattfinden. Hierzu ist nur die Synthese von viraler RNA und die Expression des N-, P- und L-Gens erforderlich (Rozenblatt et al., 1979). Eine Ausbreitung des Infektionsprozesses ist deshalb auch ohne die Expression der Glykoproteine durch direkten Zell-Zell-Kontakt oder über synaptische Kontakte möglich, wie Untersuchungen bei der SSPE gezeigt haben (Iwasaki und Koprowski 1974). Diese Ergebnisse erklären, warum in Abwesenheit von infektiösem Virus der Krankheitsprozeß bei persistent infizierten Lewis- und BN-Ratten fortschreitet.

Die Restriktion der Transkription der F- und der H-mRNA im Rattengehirn wird zusätzlich durch hohe antivirale Antikörpertiter im extrazellulären Raum verstärkt. Besonders deutlich wird dies bei BN-Ratten mit CSE und neugeborene Lewis-Ratten, denen neutralisierende anti-H-Antikörper appliziert wurden. Außerdem wird die monocistronische M mRNA, die in Tieren mit AE und SAME sehr effizient transkribiert wird, durch extrazelluläre antivirale Antikörper so stark reduziert, daß sie häufig nicht mehr nachweisbar ist (Abb. 26, 32), während die polycistronischen Transkripte, vor allem an der MF-intergenischen Region, stabiler gegenüber dem Einfluß der extrazellulären Antikörper zu sein scheinen.

Der Einfluß antiviraler Antikörper auf die intrazelluläre Virusreplikation konnte in Gewebekultur für verschiedene MV-permissive Zell-Linien gezeigt werden (Fujinami et al., 1979, 1980, 1984, Carter et al., 1983, Barrett et al., 1985). In Gegenwart neutralisierender anti-H-Antikörper kommt es zur Restriktion der Expression der viralen Strukturgene F, P und M in Hela-Zellen, die von einer zur lytischen Infektion unterschiedlichen Phosphorylierung des P-Proteins begleitet wird (Fujinami und Oldstone, 1979). Ebenso wurde in einer persistent infizierten neuronalen Zell-Linie beobachtet, daß durch Passagieren der Zellen in Gegenwart von anti-H-Antikörpern weder MV-Proteine auf der Zelloberfläche und im Zytoplasma auftreten, noch die monocistronischen mRNAs der Strukturgene nachweisbar sind (Carter et al., 1983, Barrett et al., 1985). Die genomische RNA und polycistronische Transkripte hingegen bleiben auch bei längerer Passage in Gegenwart von Antikörpern unbeeinflußt. Diese Form der Viruspersistenz ist reaktivierbar, wenn die Zellen ohne Antiserum weiterpassagiert werden (Barrett et al., 1985). Die Expression des MV-Genoms wird offensichtlich in Gegenwart antiviraler Antikörper auf transkriptioneller Ebene reguliert und somit in einen transkriptionell inaktiven Status überführt.

Dieses Phänomen einer durch Antikörper induzierten Restriktion viraler Genexpression tritt jedoch auch in vivo auf, wie die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Experimente dokumentieren. Applikation von virusneutralisierenden Antikörpern kurz nach der Infektion neugeborener Lewis-Ratten hat interessante Auswirkungen auf den Infektionsprozeß. Es

kommt nicht nur zur Unterdrückung der akuten Infektion, sondern die Tiere entwickeln nach längerer Inkubationszeit einen subakuten Krankheitsprozeß, der sich klinisch und morphologisch nicht von der SAME in älteren Lewis-Ratten unterscheidet. Molekularbiologisch findet sich neben einer transkriptionellen Restriktion der mRNAs des F- und des H-Gens eine zusätzliche Restriktion der monocistronischen mRNA für das M-Gen, die sonst in Lewis-Ratten nicht beobachtet wurde (Abb. 32). Über den Mechanismus der Signalübertragung vom extrazellulären zum intrazellulären Raum und der selektiven Beeinflussung des viralen Transkriptionskomplexes durch antivirale Antikörper ist bislang nichts bekannt. Vermutet wird z. B. eine Regulation über den cAMP-Spiegel mittels cAMP-aktivierter Proteinkinasen, da experimentelle Daten eine Restriktion der Genexpression in Abhängigkeit eines hohen, intrazellulären cAMP-Spiegels implizieren (Yoshikawa und Yamanouchi, 1984, Carter et al., 1984).

Neben den bisher beschriebenen Transkriptionsmechanismen spielen wahrscheinlich auch posttranskriptionelle Defekte bei der Etablierung der persistierenden Infektion im ZNS eine Rolle. Wie in Lewis-Ratten mit SAME gezeigt wurde, wird die mRNA für das M-Gen zwar mit hoher Effizienz transkribiert, ein M-spezifisches Translationsprodukt ist jedoch in vivo und in vitro nicht nachweisbar. Die Möglichkeit, daß aufgrund antigener Variation das Protein von den für die Experimente verwendeten monoklonalen Antikörpern nicht erkannt wird, wurde durch die Verwendung eines Hyperimmunserums eingeschränkt. Denkbar wäre auch eine erhöhte Instabilität des

Translationsproduktes durch zelluläre Proteasen, wie dies für persistierende Infektionen in Gewebekultur beschrieben wurde (Sheppard et al., 1985, 1986, Young et al., 1985). In diesen Gewebekulturexperimenten konnte gezeigt werden, daß in zwei verschiedenen, persistierend mit MV infizierten, nichtneuralen Zell-Linien eine Akkumulation von M-Protein nicht stattfindet, da die biologische Halbwertszeit dieses Proteins sehr niedrig war. Dies wurde mit Hilfe von Puls-Chase-Experimenten nachgewiesen, die einen hohen Turnover und damit eine hohe Instabilität des M-Proteins in diesen persistierenden Infektionen implizierten. Dieses Phänomen scheint jedoch nicht der Grund für die fehlende Nachweisbarkeit des M-Proteins in den Rattenhirnen zu sein, da auch in der *in vitro* Translation kein entsprechendes Protein nachweisbar ist. Da in dem zellfreien Translationssystem regulatorisch wirkende Wirtszellfaktoren keine Rolle mehr spielen, die mit der Expression der M-mRNA interferieren könnten, müßte die Ursache für einen Translationsdefekt in der mRNA selbst liegen, d. h. in der Sequenz dieser mRNA. Die Fehlerrate der RNA-Polymerasen ist verglichen mit DNA-Polymerasen sehr hoch (Holland et al., 1979, 1982, Domingo et al., 1985).

Denkbar ist die Anhäufung von Mutationen im Genen, die keinem direkten Selektionsdruck unterliegen und nicht benutzt werden. Tatsächlich wurde nachgewiesen, daß im Gehirn eines SSPE-Patienten die Sequenzvariationen der Envelope-Gene im Vergleich zur lytischen Infektion sehr hoch ist (Cattaneo et al., 1986). Es konnte für gp- und M-spezifische cDNA-Klone, die aus dem Gehirngewebe desselben SSPE-Patienten isoliert wurden,

durch Sequenzanalysen eine Mutationsfrequenz von 1% zum MV-Wildtyp auf Nukleotidebene gezeigt werden. Diese Mutationen waren zu etwa 50% stumm, in 50% hatten sie Änderungen in der Aminosäuresequenz zur Folge. Durch mutationsinduzierte Veränderungen auf Sequenzebene des MV könnte es zudem zur Einführung von zusätzlichen Stopcodons in das offene Leseraster einer mRNA kommen, die deren Translation in das entsprechende Protein frühzeitig terminieren oder gänzlich inhibieren könnte. Dies konnte durch direkte Sequenzierung für das M-Gen aus dem Gehirn eines SSPE-Patienten gezeigt werden, dessen mRNA nachweisbar vorhanden, nicht aber biologisch aktiv ist (Baczko et al., 1984): Die kodierende Sequenz enthält gleich im 12. Kodon am 5' -Ende der mRNA eine Mutation zum Stopkodon und kann somit für die Synthese der Translationsprodukte nicht mehr zur Verfügung stehen (Cattaneo et al, 1986). Sequenzdaten für die aus Lewis-Ratten mit SAME isolierten viralen mRNAs, vor allem des M-Gens, werden zeigen, ob Mutationen auch hier eine Rolle spielen.

Der Nachweis der H- und F-Proteine in den persistierend infizierten Lewis- und BN-Ratten ist durch in vitro Translationsexperimente nicht möglich (Abb. 23, 24). Aufgrund der vorliegenden molekularbiologischen Daten kann nicht abgeklärt werden, ob die zugehörigen mRNAs biologisch nicht mehr aktiv sind oder die niedrigen Konzentrationen der entsprechenden monocistronischen mRNAs Ursache dafür sind, daß diese Proteine in den beschriebenen Experimenten nicht nachgewiesen werden konnten. Die Nachweisgrenze des benutzten in vitro Translationssystems wurde in einem Verdünnungsexperiment mit mRNA aus lytisch infizierter Gewebekultur mit

25 ng MV-spezifischer +pA-RNA pro Reaktionsansatz bestimmt (Baczko et al., 1986).

Die Konsequenzen der beschriebenen Expressionsdefekte des MV in den Gehirnen akut und persistierend infizierter Lewis- und BN-Ratten für die Etablierung und Aufrechterhaltung einer persistenten zentralnervösen Infektion sind auf mehreren Ebenen zu sehen. Durch die frühzeitige Blockierung der Synthese der Glykoproteine fehlen wichtige antigene Determinanten auf infizierten Gehirnzellen als Erkennungsstrukturen für das Immunsystem. Eine Elimination der infizierten Zellen durch Antikörper und zytotoxische T-Lymphozyten bzw. NK-Zellen ("natural killer cells") ist somit stark eingeschränkt und das Überleben der Zelle und des darin möglicherweise in transkriptionell inaktiver Form vorliegenden MV gewährleistet. Diese Latenz wird weiterhin unterstützt durch das Fehlen des M-Proteins, ohne das eine Reifung und Ausschleusung des Viruspartikels aus der Zelle nicht möglich ist. Das Virus ist somit zellassoziiert und hat durch die stabile Expression des N- und des P-Gens (vermutlich auch des Polymerasegens) die Möglichkeit, als replikativer Komplex, der weiterhin infektiös bleibt (Rozenblatt 1979), im Zytoplasma der Zellen zu überleben und über Zellfortsätze andere Zellen zu infizieren (Iwasaki und Koprowski, 1974). In Gewebekulturexperimenten konnte gezeigt werden, daß durch Transfektion von MV-Nukleokapsiden ein vollständiger Replikationszyklus des MV in diesen Zellen induziert werden konnte, der mit der Freisetzung kompletter, infektiöser Viruspartikel aus den transfizierten Zellen einherging.

Tab. 9

Zusammenfassung der molekularbiologischen und immunologischen Daten zum Tiermodell und der SSPE

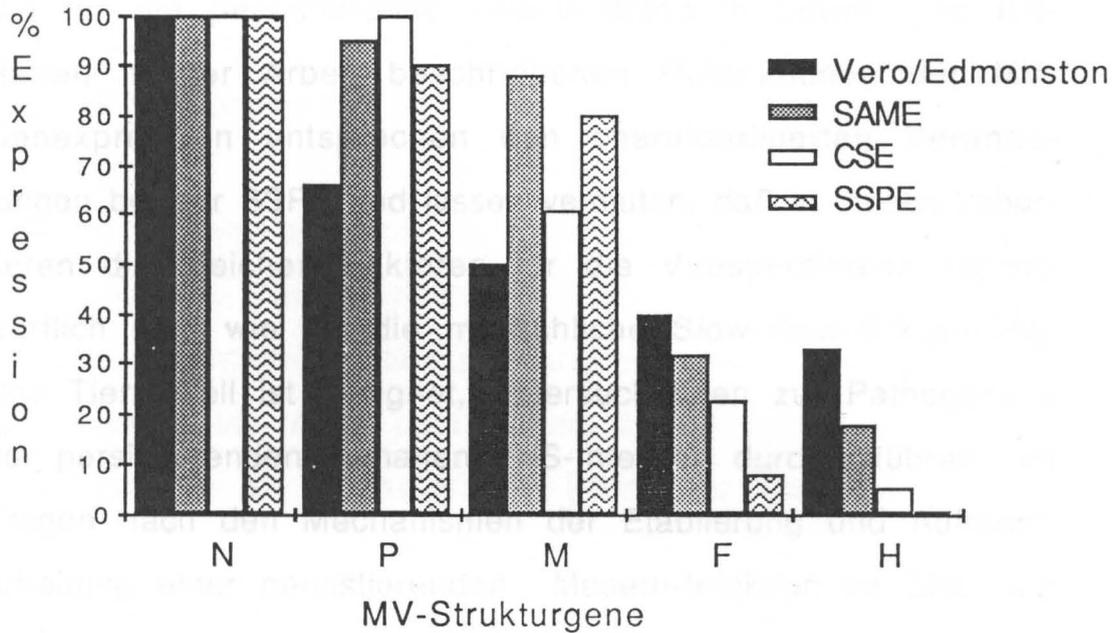
Erkrankung	mRNA					in vitro Translation				in vivo				
	N	P	M	F	H	N	P	M	H	N	P	M	F	H
SSPE I	+	+	+	(+)	(+)	+	s	+	-	+	+	+	-	-
SSPE II	+	+	+	(+)	(+)	+	l	-	-	+	+	-	+	-
SSPE III	+	bi	bi	(+)	(+)	+	+	-	-	+	+	-	+	+
SSPE IV	+	+	+	(+)	(+)	+	-	-	-	+	+	-	+	+
AE/Lewis	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
AE/BN	+	+	+	(+)	(+)	+	+	+	+	+	+	+	+	+
SAME/Lewis	+	+	+	(+)	(+)	+	+	-	(+)	+	+	-	(+)(+)	
CSE/BN	+	+	(+)	(+)	(+)	+	+	-	(+)	+	+	-	(+)(+)	
Lewis/Ak	+	+	(+)	(+)	(+)	+	+	-	-	+	+	-	(+)(+)	

Die Tabelle dokumentiert eine Zusammenstellung der Ergebnisse, die mit molekularbiologischen und immunhistologischen Methoden an Hirnmaterial von SSPE-Patienten (SSPE I - SSPE IV), Lewis- und BN-Ratten mit AE (AE/Lewis und AE/BN), Lewis- und BN-Ratten mit SAME bzw. CSE und mit neutralisierenden Antikörpern behandelten neugeborenen Lewis-Ratten (Lewis/Ak) erhalten wurden. Der Nachweis der mRNAs wurde durch Northern Blot Analysen geführt (SSPE-Daten aus Baczko et al., 1986), die in vitro Translationsdaten wurden in einem zellfreien in vitro System erhalten und die in vivo Expression wurde durch immunhistologische Untersuchungen an fixiertem Hirnmaterial bestimmt (Liebert et al., 1986, Liebert und ter Meulen, 1987). Eingeklammerte Werte bedeuten jeweils eine sehr schwache Expression der mRNA oder des Proteins, "bi" bezeichnet ein bicistronisches anstelle eines monocistronischen Transkriptes, "s" bzw. "l" geben an, daß das entsprechende in vitro Translationsprodukt kleiner bzw. größer als das in der lytischen Infektion gefundene ist.

Die immunhistologischen und molekularbiologischen Daten zur Persistenz von MV im Gehirn von Lewis- und BN-Ratten zeigen deutliche Parallelen und Übereinstimmungen mit der humanen Slow-Virus-Erkrankung SSPE. Bei dieser zentralnervösen Erkrankung treten eine Vielzahl von Defekten in der Synthese MV-spezifischer Proteine und mRNAs auf (Baczko et al., 1984, 1986, Liebert et al., 1986, Tab. 9). Wie in der CSE und der SAME sind in vivo nur N- und P- Protein in allen infizierten Gehirnzellen nachweisbar, während die Glykoproteine und das M-Protein entweder in sehr wenigen Zellen exprimiert werden oder nicht nachweisbar sind (Liebert et al., 1986). Die mRNAs für das N-, das P- und das M-Gen sind in den Gehirnen aller SSPE-Patienten in nachweisbaren Mengen vorhanden, während die gp-mRNAs verglichen mit der lytischen Infektion in Gewebekultur sehr stark reduziert sind (Baczko et al., 1984, 1986, Haase et al., 1982). Der Verlauf des Expressionsgradienten MV-spezifischer mRNAs im Gehirn von SSPE-Patienten zeigt, wie in den Rattenhirnen, einen deutlich steileren Abfall als in der lytischen Infektion (Cattaneo et al., 1987). Der Vergleich der Expressionsgradienten der MV mRNAs in der lytisch infizierten Gewebekultur, den beiden persistierenden Infektionen der Lewis- und BN-Ratten und im Gehirn eines SSPE-Patienten ist in Abb. 33 als Blockhistogramm dargestellt. In der in vitro Translation mit isolierten mRNAs aus den Gehirnen von SSPE-Patienten ist weder die Darstellung der Glykoproteine noch des M-Proteins möglich, obgleich die monocistronische M-mRNA nachweislich vorhanden ist.

Abb. 33

Quantitative Analysen der MV-spezifischen RNA Expression in den Gehirnen persistierend infizierter Lewis- und BN-Ratten, eines SSPE-Patienten und lytisch infizierter Gewebekultur



Spezifische Hybridisierungssignale für die monocistronischen mRNAs der MV-Strukturgene wurden aus den mit jeweils isolierter +pA-RNA aus den Gehirnen einer Lewis-Ratte mit SAME, einer BN-Ratte mit CSE, eines SSPE-Patienten und lytisch mit Edmonston-Virus infizierter Gewebekultur angefertigten Northern Blots ausgeschnitten. Die β -Zerfälle wurden im Szintillationszähler gezählt. Die Ergebnisse für die so ermittelten Expressionsgradienten in den vier untersuchten RNA-Präparationen sind als Blockhistogramme für die MV-Strukturgene dargestellt, wobei die Expression jedes einzelnen Strukturgens relativ zur N-Gen-Expression (N = 100%) berechnet wurde.

Diese ist - wie für einen SSPE-Fall durch Sequenzanalysen gezeigt wurde - durch eine mutationsinduzierte Basensubstitution biologisch nicht mehr aktiv (Cattaneo et al., 1986).

Die für die persistierende ZNS-Infektion in Lewis- und BN-Ratten in der Arbeit beschriebenen Restriktionen der MV-Genexpression entsprechen den charakterisierten Veränderungen bei der SSPE und lassen vermuten, daß in diesen Laborieren die gleichen Faktoren für die Viruspersistenz verantwortlich sind wie für die menschliche Slow-Virus-Erkrankung. Das Tiermodell ist geeignet, Untersuchungen zur Pathogenese der persistierenden humanen ZNS-Infektion durch-zuführen, um Fragen nach den Mechanismen der Etablierung und Aufrechterhaltung einer persistierenden Masern-Infektion im ZNS und deren Reaktivierung beim Ausbruch der Erkrankung zu klären.

6. Zusammenfassung

Die Erforschung pathogenetischer Mechanismen, die zur Etablierung und zum Erhalt persistierender ZNS-Infektionen beim Menschen führen, sind aufgrund der auftretenden meist schweren Krankheitsbilder von großem virologischen und medizinischen Interesse. Auf der Basis einer persistierenden Maserninfektion entsteht als ZNS-Komplikation die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE), die eine klassische "Slow-Virus"-Infektion darstellt und für die Defekte im Replikationszyklus des MV in post mortem entnommenen Hirngewebe der Patienten als Ursache der Persistenz definiert werden konnten.

Um die Interaktionen des Masernvirus mit dem ZNS im Verlaufe einer persistierenden Infektion charakterisieren zu können, wurden in einem Tiermodell durch intrazerebrale Inokulation mit MV eine akute und zwei unterschiedlich verlaufende persistierende ZNS-Erkrankungen in zwei verschiedenen Inzuchtstämmen (BN und Lewis) induziert und die Virus-Zellinteraktionen analysiert. Ziel dieser Arbeit war die Charakterisierung der MV-Genexpression im Gehirn von akut und persistierend infizierten Tieren beider Inzuchtstämme und ihre Korrelation zu den Krankheitsprozessen.

Die erhobenen Untersuchungsbefunde zeigen, daß die Strukturgene des Masernvirus im ZNS der Tiere in allen Krankheitsprozessen exprimiert werden. Diese Expression ist bereits wenige Tage nach der Inokulation mit dem Virus in Lewis- und BN-Ratten auf transkriptioneller Ebene restringiert. Die

Restriktion betrifft die mRNAs der beiden viralen Glykoproteine F und H und tritt zu einem Zeitpunkt auf, an dem keine Immunreaktion gegen das Virus nachweisbar ist. Dieser Befund legt eine wesentliche Bedeutung wirtszellspezifischer Faktoren bei der restringierten Transkription des MV-Genoms in Gehirn der Tiere nahe.

Neben dem Effekt von Wirtsfaktoren scheint das Immunsystem einen Einfluß auf die MV-Replikation während der Etablierung der persistierenden Infektion zu haben. Im Gehirn von neugeborenen Lewis-Ratten, die selbst keine nachweisbaren Antikörper gegen das Virus aufweisen und denen neutralisierende Antikörper appliziert wurden, konnte gezeigt werden, daß eine zusätzliche Restriktion der Transkription der mRNA des M-Gens auftritt. Das gleiche Phänomen wurde in BN-Tieren entdeckt, die im Verlauf der persistierenden Infektion einen hohen antiviralen Antikörpertiter bilden. Diese intrazellulär stattfindende transkriptionelle Restriktion steht offensichtlich in direktem Zusammenhang mit den extrazellulär vorhandenen virusneutralisierenden Antikörpern.

Neben diesen Transkriptionsdefekten konnte für die subakut erkrankten Lewis-Ratten gezeigt werden, daß die Expression des MV-Genoms auf translationeller Ebene inhibiert ist. Obwohl die mRNA des M-Gens in hohem Maße vorhanden ist, konnte weder in vivo noch in vitro ein Translationsprodukt dieser mRNA nachgewiesen werden. Diese Daten deuten darauf hin, daß die mRNA biologisch nicht aktiv ist.

Die dargestellte selektive Restriktion der MV-Genexpression in den Gehirnen von Lewis- und BN-Ratten, die die Transkription

und die Translation der beiden viralen Glykoproteine F und H und des M-Gens betrifft, führt zu einem defekten Replikationszyklus des MV in den untersuchten Gehirnen, sodaß eine Virusreifung und eine Bildung kompletter infektiöser Viruspartikel nicht mehr möglich ist. Bei defekter Synthese der Glykoproteine fehlen die hauptantigenen Strukturen des Virus auf der Oberfläche der infizierten Zellen. Dadurch ist das Immunsystem nicht mehr in der Lage, infizierte Zellen als solche zu erkennen und zu eliminieren.

Zusammen mit der wahrscheinlich wirtszellbedingten Restriktion der Synthese der glykoprotein-spezifischen mRNAs stellt der Einfluß antiviraler Antikörper einen wichtigen Parameter dar, der die Etablierung einer persistierenden ZNS-Infektion beeinflusst .

Ähnliche Defekte im Replikationszyklus der MV, wie sie bei der experimentellen Masernenzephalitis in Ratten beobachtet wurden, sind auch für die SSPE beschrieben worden. Deshalb eröffnet das Tiermodell aufgrund der dargestellten molekularbiologischen Charakteristika die Möglichkeit, Faktoren zu definieren, die für die MV-Persistenz und die mit ihr assoziierten Folgen verantwortlich sind. Diese Untersuchungen werden dazu beitragen, die Pathogenese menschlicher durch Masernvirus bedingter ZNS-Erkrankungen besser zu verstehen.

7. Liste der Abkürzungen

AE	Akute Enzephalitis
AIAM	Antikörper-induzierte antigene Modulation
APME	Akute postinfektiöse Masernenzephalitis
b	Basen
BN	Brown Norway
BSA	Rinderserumalbumin
CAM	Chorio-Allantois-Membran
cDNA	carrier DNA
CPE	zytopathischer Effekt
cRNA	carrier RNA
CSE	Klinisch stumme Enzephalitis
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytidintriphosphat
DMSO	Dimethylsulfoxid
(ds-)DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleotid
DOC	Natriumdesoxycholat
dpi	Tage nach der Infektion
DTT	Dithiothreitol
Elisa	Enzymgekoppelter Immunoabsorbent-Test
F	Fusionsprotein
FKS	Fötale Kälberserum
fmol	femtomol
gp	Glykoprotein
H	Hämagglutininprotein
HHT	Hämagglutinationshemmtest
kb	Kilo-Basen
K, kD	Kilo-Dalton
L	Large Protein (Polymeraseprotein)
M	Matrixprotein
Ma	Markerspur
MEM	Minimal Essential Medium
MG	Molekulargewicht
MOI	Multiplicity of Infection
mRNA	messenger RNA
MV	Masernvirus
N	Nukleokapsidprotein
NT	Neutralisationstest
P	Phosphoprotein

PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
+pA-RNA	polyadenylierte RNA
pmol	picomol
RBH	Rattenhirnhomogenat
rNTP (rCTP, rUTP)	Ribonukleotidtriphosphat (Ribocytidintriphosphat, Ribouridintriphosphat)
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RNAsin	Ribonuklease-Inhibitor
RNP	Ribonukleoprotein-Partikel
rRNA	ribosomale RNA
SAME	Subakute Masernenzephalitis
SDS	Natriumdodecylsulfat
ss-DNA	einzelsträngige DNA
SSPE	Subakute sklerosierende Panenzephalitis
TCID	T-cell infectious dosis
tRNA	Transfer RNA
ZNS	Zentrales Nervensystem

8. Lebenslauf

9. LITERATURVERZEICHNIS

- Agnarsdottir, G. (1977). Subacute Sclerosing Panencephalitis. In: "Recent Advances in Clinical Virology", (ed. A.P. Waterson) Edinburgh, London, New York, Churchill Livingstone 21-49.
- Albrecht, P., Shabo, A.L., Burns, G.R. and Tauraso, N.M. (1972). Experimental Measles Encephalitis in Normal and Cyclophosphamide-treated Rhesus Monkey. *Journal of Infectious Diseases* 126, 154-161.
- Alkhatib, G. and Briedis, D.J. (1986). The predicted primary structure of the measles virus hemagglutinin. *Virology* 150, 479-490.
- Arnheiter, H., Davis, N.L., Wertz, G., Schubert, M. and Lazzarini, R.A. (1985). Role of the nucleocapsid protein in regulating vesicular stomatitis virus RNA synthesis. *Cell* 41, 259-267.
- Baczko, K., Billeter, M. and ter Meulen, V. (1983). Purification and Molecular Weight Determination of Measles Virus Genomic RNA. *Journal of General Virology* 64, 1409-1413
- Baczko, K., Billeter, M. and ter Meulen, V. (1984). Expression of Measles Virus RNA in Brain Tissue. In: *Nonsegmented Negative Strand Viruses* (Eds. D.H.L. Bishop and R.W. Compans) Academic Press 233-238.
- Baczko, K., Carter, M.J., Billeter, M. and ter Meulen, V. (1984). Measles virus gene expression in subacute sclerosing panencephalitis. *Virus Research* 1, 585-595.
- Baczko, K., Liebert, U.G., Billeter, M., Cattaneo, R., Budka, H. and ter Meulen, V. (1986). Expression of Defective Measles Virus Genes in Brain Tissues of Patients with Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Journal of Virology* 59, 472-478.
- Barrett, P.N., Koschel, K., Carter, M. and ter Meulen, V. (1985). Effect of measles virus antibodies on a measles SSPE virus persistently infected C6 rat glioma cell line. *Journal of General Virology* 66, 1411-1421.
- Barrett, T. and Mahy, B.J.W. (1984). Molecular cloning of the nucleoprotein gene of canine distemper virus. *Journal of general Virology* 65, 549-557.
- Banerjee, A.K. (1987). Transcription and replication of Rhabdoviruses. *Microbiological Reviews, American Society for Microbiology* 51, 66-87.

Bellini, W.J., Englund, G., Rozenblatt, S., Arnheiter, H. and Richardson, C.D. (1985). Measles virus P gene codes for two proteins. *Journal of Virology* 53, 908-919.

Bellini, W.J., Englund, G., Richardson, C.D., Rozenblatt, S. and Lazzarini, R.A. (1986). The matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequence and deduced amino acid sequences. *Journal of Virology* 58, 408-416.

Berk, A.J. and Sharp, P.A. (1984). Sizing and mapping of early adenovirus mRNA by gelelectrophoresis of S1 endonuclease digested hybrids. *Cell* 12, 721-732.

Billeter, M.A., Baczko, K., Schmid, A. and ter Meulen, V. (1984). Cloning of DNA corresponding to four different measles virus genomic regions. *Virology* 132, 147-159.

Blumberg, B.M., Leppert, M. and Kolakofsky, D. (1981). Interaction of VSV leader RNA and Nucleocapsid protein may control VSV genome replication. *Cell* 23, 837-845.

Bohn, W., Rutter, G., Hohenberg, H., Mannweiler, K. and Nobis, P. (1986). Involvement of actin filaments in budding of measles virus: studies on cytoskeletons of infected cells. *Virology* 149, 91-106.

Bouteille, M., Fontaine, C., Vedrenne, C. and Delarue, J. (1965). Sur un cas d'encéphalite subaigue à inclusions. Etude anatomoclinique et ultrastructurale. *Reviews in Neurology* 113, 454-458.

Brown, D.M., Frampton, J., Geelet, D. and Karn, J. (1982). Sensitive detection of RNA using strand specific M13 probes. *Gene* 20, 139-144.

Buckland, R., Gerald, C., Barker, R. and Wild, T.F. (1987). Fusion glycoprotein of Measles Virus: Nucleotide Sequence of the gene and comparison with other paramyxoviruses. *Journal of General Virology* 68, 1695-1703.

Carter, M.J., Barrett, P.N., Willcocks, M.M., Koschel, K. and ter Meulen, V. (1984). Factors Involved in Measles Virus Persistence. In "Mechanisms of Viral Pathogenesis: From Gene to Pathogen" Ed. A. Kohn and P. Fuchs, Martinus Nijhoff Publishing 95-114.

Carter, M.J. and ter Meulen, V. (1987). Measles. In: Principles and Practice of Clinical Virology (Eds. A.J. Zuckerman, J.E. Banatvala and J.R. Pattison) 291-314. Cattaneo, R., Schmid, A., Rebmann, G., Baczko, K., ter Meulen, V., Bellini, W.J., Rozenblatt, S. and Billeter,

- M.A. (1986). Accumulated Measles Virus Mutations in a Case of Subacute Sclerosing Panencephalitis: Interrupted Matrix Protein Reading Frame and Transcription Alteration. *Virology* 154, 97-107.
- Cattaneo, R., Rebmann, G., Baczko, K., ter Meulen, V. and Billeter, M.A. (1987). Unbalanced levels of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology*
- Chirgwin, J.M., Przybyla, A.E., MacDonald, R.J. and Rutter, W.J. (1979). Isolation of biologically active ribonucleic acids from sources enriched in ribonuclease. *Biochemistry* 18, 5294-5299.
- Choppin, P.W. and Compans, R.W. (1975). Paramyxoviruses. In: "Comprehensive Virology" Chapter 4 (Eds. H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner) 95-178.
- Connolly, J.H., Allen, I.V., Hurwitz, L.J. and Miller, J.H.D. (1967). Measles-virus Antibody and Antigen in Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Lancet* 1, 542-544.
- Connolly, J.H. (1968). Additional Data on Measles Virus Antibody and Antigen in Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Neurology* 18, 87-89.
- Davis, L.G., Dibner, M.D. and Battey, J.F. (1986). Basic methods in molecular biology. Elsevier New York, Amsterdam, London
- Dowling, P.C., Blumberg, B.M., Menonna, J., Adams, J.E., Cook, P., Crowley, J.C., Kolakofsky, D. and Cook, S.D. (1986). Transcriptional map of the measles virus genome. *Journal of General Virology* 67, 1987-1992.
- Esiri, M.M., Oppenheimer, D.R., Brownell, B. and Haire, M. (1982). Distribution of measles antigen and immunoglobulin-containing cells in the CNS in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) and atypical measles encephalitis. *Journal of Neurological Sciences* 53, 29-43.
- Favaloro, J.R., Treisman, R. and Kamen, R. (1980). Transcription maps of polyoma virus-specific RNA: Analysis by two-dimensional nuclease S1 gel mapping. In: "Methods in Enzymology" (L. Grossman and K. Maldeve, eds.). Academic Press, New York 65, 718-749.
- Fenner, F. (1976). Classification and nomenclature of viruses. Second report of the International committee on Taxonomy of Viruses. *Intervirology* 7, 1-115.

Fournier, J.G., Tardieu, M., Lebon, P., Robain, O., Ponsot, G., Rozenblatt, S. and Bouteille, M. (1985). Detection of measles virus RNA in lymphocytes from peripheral blood and brain perivascular infiltrates of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *New England Journal of Medicine* 10, 910-915.

Freeman, J.M., Magoffin, R.L., Lennette, E.H. and Herndon, R.M. (1967). Additional Evidence of the Relations between Subacute Inclusion-body Encephalitis and Measles Virus. *Lancet* 2, 129-131.

Fujinami, R.S. and Oldstone, M.B.A. (1979). Antiviral Antibody Reacting on the Plasma Membrane Alters Measles Virus Expression Inside the Cell. *Nature* 279, 529-530.

Fujinami, R.S. and Oldstone, M.B.A. (1980). Alterations in Expression of Measles Virus Polypeptides by Antibody: Molecular Events in Antibody-induced Antigenic Modulation. *Journal of Immunology* 125, 78-85.

Fujinami, R.S., Norrby, E. and Oldstone, M.B.A. (1984). *Journal of Immunology* 132, 2618-2621.

Gendelman, H.E., Wolinsky, J.S., Johnson, R.T., Pressman, N.J., Pezeshkpour, G.H. and Boisset, G.F. (1984). Measles encephalomyelitis: lack of evidence of viral invasion of the central nervous system and quantitative study of the nature of demyelination. *Annals of Neurology* 15, 353-360.

Gerald, C., Buckland, R., Barker, R., Freeman, G. and Wild, T.F. (1986). Measles Virus Hemmagglutinin gene: cloning, complete nucleotide sequence analysis and expression in COS cells. *Journal of General Virology* 67, 2695-2703.

Giorgi, C., Blumberg, B.M. and Kolakofsky, D. (1983). Sendai virus contains overlapping genes expressed from a single mRNA. *Cell* 35, 829-836.

Giraudon, P. and Wild, T.F. (1985). Correlation between epitopes on hemagglutinin of measles virus and biological activity. *Virology* 144, 46-58.

Giuffre, R.M., Tovell, D.R., Kay, C.M. and Tyrell, D.L.J. (1982). Evidence for an interaction between the membrane protein of a paramyxovirus and actin. *Journal of Virology* 42, 963-968.

Gorecki, M. and Rozenblatt, S. (1980). Cloning of DNA complementary to the measles virus mRNA encoding nucleocapsid protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 77, 3686-3690.

- Graves, M.C., Silver, S.M. and Choppin, P.W. (1978). Measles Virus Polypeptide Synthesis in Infected Cells. *Virology* 86, 254-263.
- Gorecki and Rozenblatt, (1980). Proceedings of the National Academy of Sciences, USA 77, 3686-3690.
- Greer, P.A., Hasel, K.W. and Millward S. (1986). Cloning and in vitro expression of the measles virus matrix gene. *Biochemistry and Cell Biology* 64, 1038-1043.
- Gupta, K.C. and Kingsbury, D.W. (1985). Polytranscripts of Sendai virus do not contain intervening polyadenylate sequences. *Virology* 141, 102-109.
- Haase, A.T., Ventura, P., Gibbs, C.J. and Tourtellotte, W.W. (1980,1). Measles virus nucleotide sequences: Detection by hybridization in situ. *Science* 212, 672-675.
- Haase, A.T., Swoveland, P., Stowring, L., Ventura, P., Johnson, K.P., Norrby, E. and Gibbs Jr, C.J. (1981). Measles Virus Genome in Infections of the Central Nervous System. *The Journal of Infectious Diseases* 144, 154-160.
- Haase, A.T., Brahic, M., Stowring, L. and Beuth, H. (1984). Detection of viral nucleic acids by in situ hybridization. *Methods in Virology* 7, 189-226.
- Haase, A.T., Gantz, D., Eble, B., Walker, D., Stowring, L., Ventura, P., Blum, H., Wietgreffe, S., Zupancic, M., Tourtelotte, W., Gibbs, C.J.Jr., Norrby, E. and Rozenblatt, S. (1985). Natural history of restricted synthesis and expression of measles virus genes in subacute sclerosing panencephalitis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the USA 82, 3020-3024.
- Hall, W.W. and Ter Meulen, V. (1976). RNA homology between subacute sclerosing panencephalitis and measles viruses. *Nature* 264, 474-477.
- Hayashi, S., Gillam, I., Delaney, A.D. and Tener, G.M. (1978). Acetylation of chromosome squashes of *Dros. melanogaster* decreases the background in autoradiographs from hybridization with ¹²⁵I-labelled RNA. *Journal of Histochemical Cytochemistry* 26, 677-679.
- Holland, J., Spindler, K., Horodyski, F., Grabau, E., Nichol, S., and Vandepol, S. (1982). Rapid evolution of RNA genomes. *Science* 215, 1577-1585.
- Holland, J.J., Grabau, E.A., Jones, C.L. and Sember, B.L. (1979). Evolution of Multiple Genome Mutations During Long-term Persistent Infection by Vesicular Stomatitis Virus. *Cell* 16, 495-504.

- Horta-Barbosa, L., Fuccillo, D.A., Sever, J.L. and Zeman, W. (1969). Subacute Sclerosing Panencephalitis: Isolation of Measles Virus from a Brain Biopsy. *Nature* 221, 974.
- Hunt, T. (1985). False starts in translational control of gene expression. *Nature (London)* 316, 580-581.
- Hyypiä, T., Korkiamäki, P. and Vainionpää, R. (1985). Replication of measles virus in human lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* 161, 1261-1271.
- Iverson, L.E. and Rose, J.K. (1981). Localized attenuation and discontinuous synthesis during vesicular stomatitis virus transcription. *Cell* 23, 477-484.
- Iwasaki, Y. and Koprowski, H. (1974). Cell to Cell Transmission of Virus in the Central Nervous System. *Laboratory Investigation* 31, 187-196.
- Johnson, R.T. Griffin, D.E., Hirsch, R.L., Wolinsky, J.S., Roedenbeck, S. and DeSoriano, I.L. (1984). Measles encephalomyelitis: clinical and immunological studies. *New England Journal of Medicine* 310, 137-141.
- Joseph, B.S., Lampert, P.W. and Oldstone, M.B.A. (1975). Replication and persistence of measles virus in defined subpopulations of human leukocytes. *Journal of Virology* 16, 1638-1649.
- Katz, M. and Koprowski, H. (1973). The Significance of Failure to Isolate Infectious Viruses in Cases of Subacute Sclerosing Panencephalitis. *Archiv für die gesamte Virusforschung* 41, 390-393.
- Kingsbury, D.W., Bratt, M.A., Choppin, P.W., Hanson, R.P., Hosaka, Y., ter Meulen, V., Norrby, E., Plowright, W., Rott, R. and Wunner, W.H. (1978). Paramyxoviridae. *Intervirology* 10, 137-152.
- Kingsbury, D.W. (1985). Orthomyxo- and paramyxoviruses and their replication. In: "Virology" (B.N. Fields, Ed.) pp. 1157-1178, Raven Press, New York.
- Kolakofsky, D. and Blumberg, B.M. (1982). A model for the control of nonsegmented negative strand virus genome replication; In: Mahy, Minson, Darby "Virus Persistence". Cambridge University Press, Cambridge 203-213.
- Krieg, P.A. and Melton, D.A. (1984). Functional mRNAs are produced by SP6 in vitro transcription of cloned cDNAs. *N.A.R.* 12, 7057-7070.

- Laemmli, U.K. (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680-685.
- Lamb, R.A., Etkind, P.R. and Choppin, P.W. (1978). Evidence for a ninth influenza viral polypeptide. *Virology* 91, 60-78.
- Lazzarini, R.A., Baltimore, J.D. and Schubert, D. (1981). The origins of defective interfering particles of the negative-strand RNA viruses. *Cell* 26, 145-154.
- Liebert, U.G., Baczko, K., Budka, H. and ter Meulen, V. (1986). Restricted expression of measles virus proteins in brains from cases of subacute sclerosing panencephalitis. *Journal of General Virology* 67, 2435-2444.
- Liebert, U.G. and ter Meulen, V. (1987). Virological aspects of measles virus induced encephalomyelitis in Lewis and BN rats. *Journal of General Virology* 68, 1715-1722.
- Liebert, U.G., Linnington, C. and ter Meulen, V. (1988). Induction of autoimmune reactions to myelin basic protein in measles virus encephalitis in Lewis rats. *Journal of Neuroimmunology* 17, 103-118.
- Machamer, C.E., Hayes, E.C., Gollobin, S.D., Westfall, L.K. and Zweerink, H.J. (1980). Antibodies against the measles matrix polypeptide after clinical infection and vaccination. *Infection and Immunity* 27, 817-825.
- Maniatis, T., Fritsch, E.F. and Sambrook, J. (1982). "Molecular Cloning. A Laboratory Manual". Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 202-203.
- Maples, J.A. (1985) *AJCP* 83, 356.
- Melton, D.A., Krieg, P.A., Rebagliati, M.R., Maniatis, T., Zinn, K. and Green, M.R. (1984). Efficient in vitro synthesis of biologically active RNA and RNA hybridization probes from plasmids containing a bacteriophage SP6 promoter. *N.A.R.* 12, 7035-7056.
- Merz, D.C., Scheid, A. and Choppin, P.W. (1980). Importance of antibodies to the fusion glycoprotein of paramyxoviruses in the prevention of spread of infection. *Journal of Experimental Medicine* 151, 275-288.
- Messing, J. (1979). In: *Methods in Enzymology* 101 (part C): Recombinant DNA (R. Wu, L. Grossman and K. Maldeve, eds.). Academic Press, New York. 20-78.

Meulen ter, V. and Carter, M.J. (1984). Measles Virus Persistency and Disease. Progress in Medical Virology (Eds. J.L.Melnick, K.Hummeler), Karger, Basel 30, 44-61.

Morgan, E.M. and Rapp, R. (1977). Measles Virus and Its Associated Diseases. Bacteriological Reviews 41, 636-666.

Mountcastle, W.E. and Choppin, P.W. (1977). A Comparison of the Polypeptides of Four Measles Virus Strains. Virology 78, 463-474.

Müller, D., und Ter Meulen, V. (1969). Immunhistologische, feingewebliche und neurochemische Untersuchungen bei Encephalitiden. II. Die subakute progressive panencephalitis. Neurohistologische und histochemische Studien. Acta Neuropathologica 12, 227-243.

Nakashima, K., Chanda, P., Deutsch, V., Bauerjee, A.K. and Shatkin, A.J. (1979). Inactivation of influenza and VSV virion RNA polymerase activities by photoreaction with 4'substituted psoraeen. Journal of Virology 32, 838-844.

Paterson, R.G. and Lamb, R.A. (1987). Ability of the Hydrophobic Fusion-Related External domain of Paramyxovirus F-Protein to act as a Membrane Anchor. Cell 48, 441-452.

Rammohan, K.W., Dubois-Dalcq, M., Rentier, B. and Pauli, J. (1983). Experimental models to study measles virus persistence in the nervous system. In: Progress in Neuropathology, ed. by H.M. Zimmermann. New York: Raven Press 5, 113-137.

Richardson, C.D., Scheid, A. and Choppin, P.W. (1980). Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F₁ and HA₂ viral polypeptides. Virology 105, 205-222.

Richardson, C., Hull, D., Green, P., Hasel, K., Berkovich, A., Englund, G., Bellini, W.B., Rima, B.K. and Lazzarini, R. (1986). The nucleotide sequence of the mRNA encoding the fusion protein of measles virus (Edmonston strain): A comparison of fusion proteins of several paramyxoviruses. Virology 155, 508-523.

Rima, B.K. (1983). The proteins of morbilliviruses. Journal of General Virology 64, 1205-1219.

Rima, B.K., Baczko, K., Clarke, D.K., Curran, M.D., Martin, S.J., Billeter, M. and ter Meulen, V. (1986). A Complete Transcriptional Map for Morbilliviruses. Journal of General Virology 67, 1971-1978.

Rima, B.K., Baczko, Imagawa, D.T. and ter Meulen, V. (1987). Humeral Immune Response in Dogs with Old Dog Encephalitis and Chronic Distemper Meningo-encephalitis. *Journal of General Virology* 68, 1723-1735.

Rozenblatt, S., Koch, T., Pinhasi, O. and Bratasin, S. (1979). Infective Substructures of Measles virus from Acutely and Persistently Infected Cells. *Journal of Virology* 32, 329-333.

Rozenblatt, S., Gorecki, M., Shure, H. and Prives, L.L. (1979). Characterisation of measles virus specific proteins synthesised in vitro and in vivo from acutely and persistently infected cells. *Journal of Virology* 29, 1099-1106.

Rozenblatt, S., Eizenberg, O., Ben-Levy, R., Lavie, V. and Bellini, W.J. (1985). Sequence homology within the morbilliviruses. *Journal of Virology* 53, 684-690.

Russell, S.E.H., Clarke, D.K., Hoey, E.M., Rima, B.K. and Martin, S.J. (1985). cDNA cloning of the messenger RNAs of five genes of canine distemper virus. *Journal of General Virology* 66, 977-983.

Sap, J., Munoz, A., Damm, K., Goldberg, Y., Glysdal, J., Leutz, A., Berg, H. and Vennstran, B. (1986). The c-erb-A-protein is a high affinity receptor for thyroid hormone. *Nature (London)* 324, 635-640.

Scheid, A. and Choppin, P.W. (1977). Two disulfide-linked polypeptide chains constitute the active F protein of paramyxoviruses. *Virology* 80, 54-66.

Shapshak, P., Graves, M.C. and Imagawa, D.T. (1982). Polypeptides of canine distemper virus strains derived from dogs with chronic neurological diseases. *Virology* 122, 158-170.

Shapshak, P., Tourtellotte, W.W., Wolman, M., Verity, N., Verity, M.A., Schmid, P., Syndulko, K., Bedows E., Boostanfar, R., Darvish, M., Nakamura, S., Tomiyasu, U., Steiner, R.C., Hawkins, S., Hoffman, D., Adhami, F. and Martinez S. (1986). Search for virus nucleic acid sequences in postmortem human brain tissue using in situ hybridization technology with cloned probes: some solutions and results on progressive multifocal leukoencephalopathy and subacute sclerosing panencephalitis tissue. *Journal of Neuroscience Research* 16, 281-301.

Shapshak, P., Tourtellotte, W.W., Nakamura, S., Graves, M.C., Darvish, M., Hoffman, D., Walsh, M.J., Fareed, G.C., Schmid, P., Heinzmann, C., Sidhu, K., Bedows, E., Rozenblatt, S., Berry, K. and Hawkins, S. (1985). Subacute sclerosing panencephalitis: Measles virus matrix protein nucleic acid sequences detected by in situ hybridization. *Neurology* 35, 1605-1609.

Sheppard, R.D., Raine, C.S., Bornstein, M.B. and Udem, S. (1985). Measles virus matrix protein synthesized in a subacute sclerosing panencephalitis cell line. *Science* 228, 1219-1221.

Sheppard, R.D., Raine, C.S., Bornstein, M.B. and Udem, S. (1986). Rapid degradation restricts measles virus matrix protein expression in a subacute sclerosing panencephalitis cell line. *Proceedings of the National Academy of Sciences, USA* 83, 7913-7917.

Stallcup, K.C., Wechsler, S.L. and Fields, B.N. (1979). Purification of measles virus and characterisation of subviral components. *Journal of Virology* 30, 166-176.

Stallcup, K.C., Raine, C.S. and Fields, B.N. (1983). Cytochalasin B inhibits the maturation of measles virus. *Virology* 124, 59-74.

Strauss, E.G. and Strauss, J.H. (1983). Replication strategies of the single stranded RNA viruses of encasoyotes. In: "Current topics in Microbiology and Immunology" M. Cooper, P.H. Hofschneider, H. Koprowski, F. Melchers, R. Rott, H.G. Schweiger, P.K. Vogt, R. Zinker-nagel, eds. Berlin, Springer Verlag 1-98.

Sutcliffe, J.G., Milner, R.J., Gottesfeld, J.M. and Lerner, R.A. (1984). Identifier sequences are transcribed specially in the brain. *Nature* 308, 237-241.

Tellez-Nagel, J. and Harter, D.H. (1966). Subacute Sclerosing Leuco-encephalitis: Ultrastructure of Intranuclear and Intracytoplasmic Inclusions. *Science* 154, 899-901.

Ter Meulen, V., Käckell, Y., Müller, D., Katz, M. and Meyermann, R. (1972). Isolation of infectious measles virus in measles encephalitis. *Lancet* 2, 1172-1175.

Ter Meulen, V. and Carter, M. (1982). Mechanisms of conventional virus persistence in the nervous system. In: "Neurology" *Proceedings of the World Congress of Neurology* (Eds. S. Katsuki, T. Tsubaki and Y. Toyokura) *Excerpta Medica* 568, 390-403.

Ter Meulen, V., Kreth, H.W. and Carter, M.J. (1982). Immunological Aspects of Slow Virus Infections of the Nervous System. In: *Clinics in Immunology and Allergy "Immunoneuropathology"* (ed. B.H. Waksman), W.B. Saunders Ltd. Great Britain 2, 425-456.

Ter Meulen, V., Stephenson, J.R. and Kreth, H.W. (1983). Subacute sclerosing panencephalitis. In: "Comprehensive Virology" Eds. H. Fraenkel-Conrat and R.R. Wagner 18, 105-159.

- Tourtellotte, H.W., Verity, A.N., Martinez, S. and Shapshak, P. (1987). Covalent binding of formalin fixed paraffin embedded brain tissue sections to glass slides suitable for in situ hybridization. *Journal of Virological Methods* 15, 87-99.
- Tyrrell, D.L.J. and Norrby, E. (1978). Structural Polypeptides of Measles Virus. *Journal of General Virology* 39, 19-230.
- Udem, S.A. and Cook, K.A. (1984). Isolation and characterisation of measles virus intracellular nucleocapsid RNA. *Journal of Virology* 49, 57-65.
- Vainionpää, R. (1979). Measles virus-specified polypeptides in infected cells. *Archives of Virology* 60, 239-248.
- Varsanyi, T.M., Jörnvall, H. and Norrby, E. (1985). Isolation and characterization of the measles Virus F₁ polypeptide: comparison with other paramyxovirus fusion proteins. *Virology* 147, 110-117.
- Villarreal, L.P., Breindl, M., and Holland J.J. (1976). *Biochemistry* 15, 1663-1667.
- Walsh, E.E., Schlesinger, J.J., and Brandriss, M.W. (1984). Purification and characterization of GP90, one of the envelope glycoproteins of respiratory syncytial virus. *Journal of General Virology* 86, 761-767.
- Wang, E., Wolf, B.A., Lamb, R.A., Choppin, P.W. and Goldberg, A.R. (1976). The presence of actin in enveloped viruses. In: "Cell Motility" (R. Goldman, T. Pollard, J. Rosenbaum, eds.). Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York 589-599.
- Wong, T.C., Wipf, G. and Hirano, A. (1987). The measles virus matrix gene and gene product defined by in vitro and in vivo expression. *Virology* 157, 497-508.
- Wear, D.J. and Rapp, F. (1971). Latent Measles Virus Infection of the Hamster Central Nervous System. *Journal of Immunology* 107, 1593-1598.
- Wechsler, S.L. and Fields, B.N. (1978). Intracellular synthesis of measles virus-specific polypeptides. *Journal of Virology* 25, 285-297.
- Winnacker, E.L. (1984). *Gene und Klone. Eine Einleitung in die Gentechnologie.* Verlag Chemie.

Yoshida, T., Nagai, Y., Yoshii, S., Maeno, K. and Matsumoto, T. (1976). Membrane protein of HVJ (Sendai virus): Its role in virus assembly. *Virology*. 71, 143-161.

Yoshikawa, Y. and Yamanouchi, K. (1984). Effects of papaverine treatment on replication of measles virus in human neural and nonneural cells. *Journal of Virology*. 50, 489-496.

Young, K.K.Y., Heineke, B.E. and Wechsler, S.L. (1985). M protein instability and lack of H protein associated with nonproductive persistent infection of HeLa cells by measles virus. *Virology*. 143, 536-545.