

Aus dem Institut für Virologie und Immunbiologie
der Universität Würzburg

Vorstand: Professor Dr. med. Axel Rethwilm

Hemmung der Masernvirusreplikation durch RNA-Interferenz



Inaugural - Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde der
Medizinischen Fakultät
der
Julius-Maximilians-Universität Würzburg

vorgelegt von

Michael Benedikt Zinke

aus Mutlangen

Würzburg, September 2012

Referent: Professor Dr. rer. nat. Jürgen Schneider-Schaulies
Koreferentin: Professor Dr. med. Alexandra Schubert-Unkmeir
Dekan: Professor Dr. med. Matthias Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 4.11.2013

Der Promovend ist Arzt.

Für Mama und Papa

I. Inhaltsverzeichnis	I
1 Einleitung	1
1.1 Biologie des Masernvirus	1
1.1.1 Taxonomie	1
1.1.2 Morphologie	2
1.1.3 Genomaufbau und virale Proteine	3
1.1.4 Vermehrungszyklus des Masernvirus	9
1.2 Masern	12
1.2.1 Bedeutung und Epidemiologie	12
1.2.2 Pathogenese	15
1.2.3 Klinik	17
1.2.4 Diagnostik	24
1.2.5 Therapie und Prophylaxe	26
1.3 RNA-Interferenz (RNAi)	27
1.3.1 Mechanismus der RNAi	28
1.3.2 Klinische Anwendung der RNAi	33
1.4 Ziel der Arbeit	35
2 Material	37
2.1 Zellen	37
2.2 Bakterien	37
2.3 Viren	38
2.4 Plasmide	38
2.5 DNA-Oligonukleotide und Peptide	39
2.5.1 DNA-Oligonukleotide zur Herstellung der <i>shRNAs</i>	39
2.5.2 Primer	41
2.5.3 DNA-Standard für Agarose-Gele	42
2.6 Peptide	43
2.7 Nährmedien und Seren	43
2.8 Lösungen und Puffer	45
2.9 Antibiotika	47
2.10 Antikörper	47
2.10.1 Primärantikörper	47
2.10.2 Sekundärantikörper	48

2.11 Chemikalien	48
2.12 Enzyme	49
2.13 Restriktionsenzyme und deren Puffer	49
2.14 Kits	50
2.16 Glasmaterialien	52
2.17 Geräte	53
2.18 Software	55
3 Methoden	57
3.1 Zellbiologische Methoden	57
3.1.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien	57
3.1.2 Zellzählung	57
3.1.3 Konservierung eukaryotischer Zellen	58
3.1.4 Transfektion	59
3.1.5 Durchflusszytometriemessungen (<i>FACS</i> -Analyse)	60
3.1.6 <i>MTT</i> -Vitalitätstest	61
3.2 Histochemische Methoden	62
3.2.1 Immunfluoreszenzfärbung für durchflusszytometrische Messungen	62
3.3 Molekularbiologische Methoden	62
3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren	62
3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese	63
3.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (<i>QIAquick® Gel Extraction Kit</i>)	63
3.3.4 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA	64
3.3.5 Restriktionsverdau von DNA	65
3.3.6 Gezielte Mutagenese (<i>QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit</i>)	66
3.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten	67
3.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (<i>PCR</i>)	68
3.3.9 Herstellung von <i>shRNA</i> -Oligos	69
3.3.10 Ethanolpräzipitation	71
3.3.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten	71
3.3.12 Plasmidisolierung aus <i>E. coli</i> -Bakterien	72
3.3.13 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (<i>QIAprep® Spin Miniprep-Kit</i>)	72
3.3.14 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA (<i>Plasmid Maxi Kit</i>)	73
3.3.15 Sequenzierung (<i>Big Dye® Cycle Sequencing Kit version 3.1</i>)	74

3.4 Virologische Methoden	75
3.4.1 Virusvermehrung und -präparation	75
3.4.2 Infektion von adhärennten Zellen	76
3.4.3 Herstellung lentiviraler Partikel	76
3.4.4 Ultrazentrifugation der lentiviralen Partikel (<i>Amicon® Ultra-15</i>)	77
3.4.5 Transduktion der lentiviralen Partikel	77
3.4.6 Inhibition der Fusion von MV infizierten NT2-Zellen	77
3.4.7 Virustiterbestimmung mittels Plaquetest	78
3.4.8 Virustiterbestimmung mittels Endpunkttitration	79
3.4.9 Herstellung persistierend infizierter NT2-Zellen	79
4 Ergebnisse	81
4.1 Entwicklung, Herstellung und Etablierung eines <i>RNAi</i>-Indikatorsystems	81
4.1.1 Herstellung von <i>shRNA</i> -exprimierenden Vektoren	83
4.1.2 Herstellung der Indikatorplasmide	95
4.1.3 Testung verschiedener Zelllinien auf Transfektionseffizienz als Grundlage des <i>RNAi</i> -Quantifizierungssystems	102
4.1.4 Vergleich des Zeitpunktes der Expression der Fluoreszenzproteine durch lentiviralen Vektor und Indikatorplasmid	105
4.2 Test der <i>shRNA</i>-Sequenzen im <i>RNAi</i>-Indikatorsystem	106
4.2.1 Test der gegen das L-Protein gerichteten <i>shRNA</i> -Sequenzen	110
4.2.2 Test der gegen das M-Protein gerichteten <i>shRNA</i> -Sequenzen	111
4.2.3 Test der gegen das N-Protein gerichteten <i>shRNA</i> -Sequenzen	112
4.2.4 Test der gegen das P-Protein gerichteten <i>shRNA</i> -Sequenzen	113
4.2.5 Auswertung des <i>RNAi</i> -Indikatorsystems	113
4.2.6 Test der nicht-komplementären <i>shRNA</i> -Sequenzen	114
4.3 Test der <i>RNAi</i> auf Inhibition der Virusreplikation in vitro	116
4.3.1 Test der <i>shRNA</i> -Sequenzen auf die Inhibierung einer akuten viralen Infektion	116
4.3.2 Die <i>shRNA</i> -Sequenzen <i>L4</i> , <i>M4</i> , <i>N1</i> , <i>P6</i> und ihre Anwendung bei persistierend-infizierten Zellkulturen	118
4.4 Entwicklung eines in vivo-Modells (Herstellung transgener Mäuse)	139
4.4.1 Umklonierung der Vektoren <i>pF6gW-M4</i> und <i>-P6</i>	139
4.4.2 Herstellung lentiviraler Partikel aus <i>pF6gW-Thy1.1-M4</i> und <i>-P6</i> , Expressionsanalyse und Titration	141

5. Diskussion	146
5.1 <i>SiRNA</i> -induzierte Hemmung der Masernvirusreplikation in vitro	146
5.2 Applikation von <i>siRNAs</i> als Therapeutikum in vivo	151
5.3 Ausblick	155
6. Zusammenfassung	157
7. Literaturverzeichnis	159
8. Anhang	182
8.1 Abkürzungsverzeichnis	182
8.2 Abbildungsverzeichnis	190
8.3 Tabellenverzeichnis	195
9 Danksagung	197
10 Curriculum Vitae	199

1 Einleitung

1.1 Biologie des Masernvirus

1.1.1 Taxonomie

Nach der derzeit aktuellen Einteilung des *International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV)* aus dem Jahre 2002 ist das Masernvirus (MV) der Virusfamilie der *Paramyxoviridae* zugehörig. Zusammen mit den *Rhabdoviridae* und *Filoviridae* bilden sie die Ordnung der *Mononegavirales*, welche sämtliche einzelsträngige RNA-Viren negativer Polarität beinhalten. Es ist ferner Mitglied der Subfamilie der *Paramyxovirinae* und des Genus *Morbillivirus*. Innerhalb dieses Genus finden sich mit Ausnahme des Masernvirus, ausschließlich tierpathogenen Viren: das *Hundestaupavirus (CDV)*, das *Rinderpestvirus (RPV)*, das *Peste-des-Petits-Ruminants-Virus (PPRV)* und die *Robbenstaupaviren (PDV)* [1; 2]. Eine Übersicht der humanpathogenen Vertreter aus der Familie der *Paramyxoviridae* ist der Abbildung 1.1 zu entnehmen:

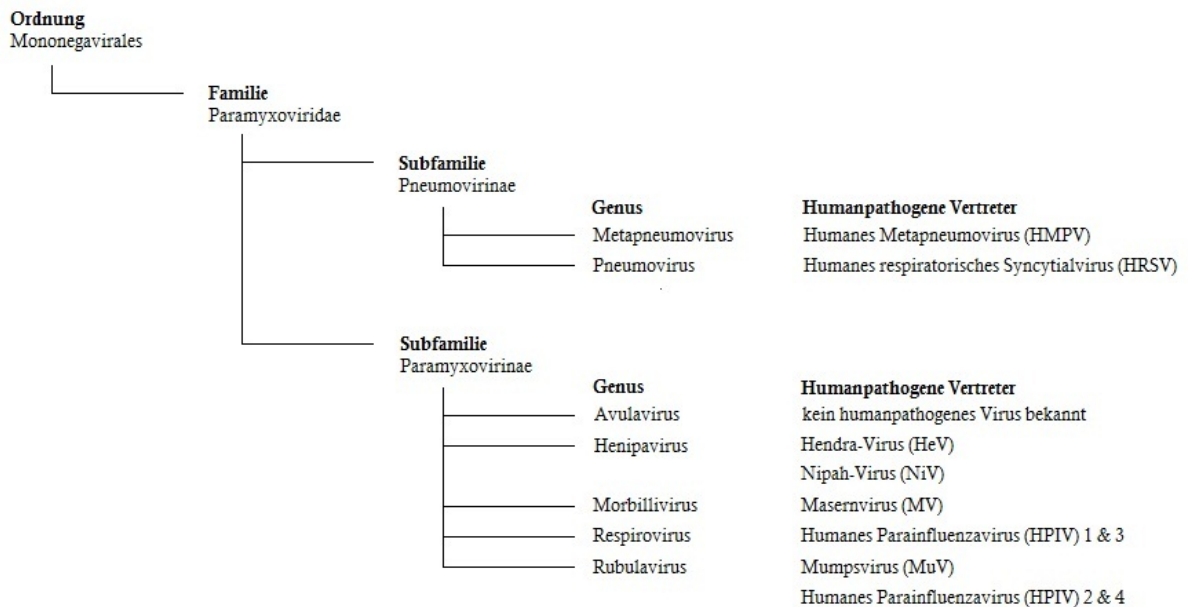


Abb. 1.1 | Eine Übersicht der Virusfamilie *Paramyxoviridae* und deren humanpathogene Vertreter

1.1.2 Morphologie

Elektronenmikroskopisch stellt sich ein Masernviruspartikel als pleomorphes, überwiegend sphärisches Partikel von 150 bis 300 nm Größe dar (s. Abbildung 1.2B). Umgeben von einer Lipiddoppelschicht ist im Inneren des Virions der virale Ribonukleinkomplex (RNP) lokalisiert. Er besteht aus einem einzelsträngigen Negativstrang-RNA-Genom, das mit den Masernproteinen *L* (*Large-Protein*), *N* (*Nucleokapsidprotein*) und *P* (*Phosphoprotein*) helikal aggregiert ist. Das L-Protein, welches stets mit dem P-Protein assoziiert vorliegt, besitzt die enzymatische Aktivität einer *RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RaRp)*. Das N-Protein stellt die Hauptkomponente des Nucleokapsids. Die das Virus umgebende Lipiddoppelschicht wird von zwei viralen Transmembranproteinen bzw. Oberflächenproteinen durchspannt, dem *F* (*Fusions-*)-*Protein* und dem *H* (*Hämagglutinin-*)-*Protein*. An der Innenseite der Membran befindet sich das *M*- (*Matrix-*)-*Protein*, ein peripheres Membranprotein, das sowohl mit zytoplasmatischen Anteilen des F-Proteins interagiert, als auch mit dem Ribonukleoproteinkomplex assoziiert ist [3]. Im Gegensatz zu den Proteinen F und H wird es nicht an der Oberfläche exprimiert, sondern kleidet vielmehr die Innenseite des Viruspartikels aus. Eine genauere Betrachtung der viralen Proteine ist dem Kapitel 1.1.3 zu entnehmen.

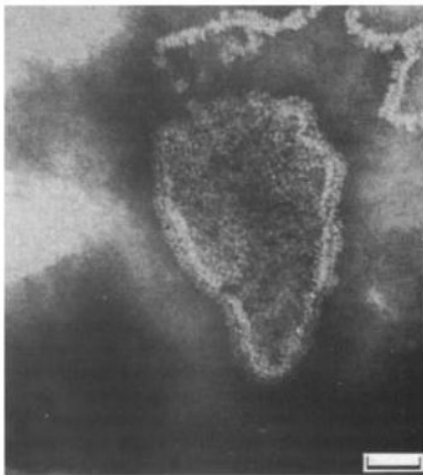
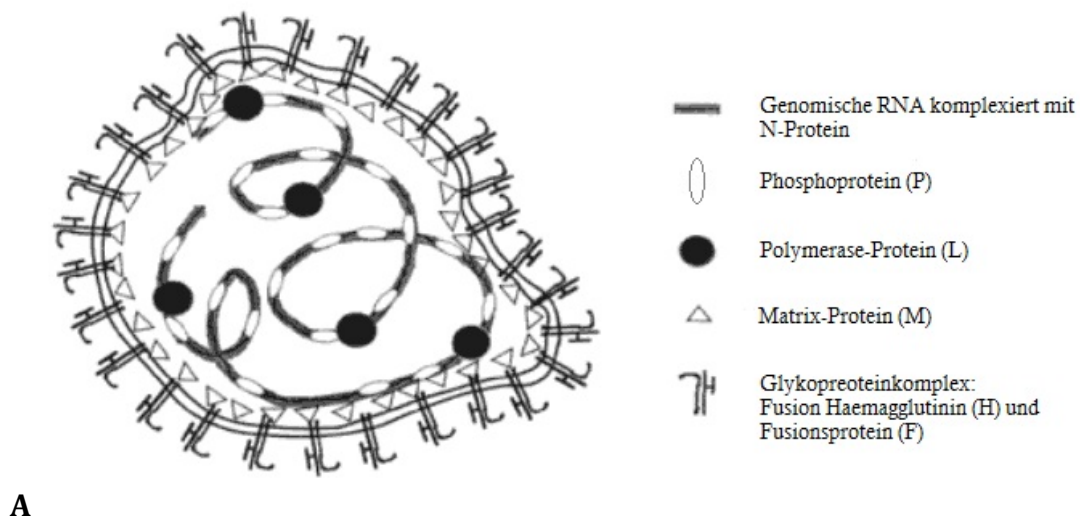


Abb. 1.2 | Masernviruspartikel

A: Schematische Darstellung eines Masernviruspartikels (modifiziert nach [4])

B: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Masernviruspartikels [5], Länge des Messbalkens: 50 nm

1.1.3 Genomaufbau und virale Proteine

Das Genom des Masernvirus ist ein nichtsegmentiertes RNA-Molekül negativer Polarität von ca. 16 kb Länge. Die virale RNA kodiert für insgesamt 6 Strukturgene, deren Leseraster linear angeordnet sind und sich gegenseitig nicht überlappen. Die Abfolge der Gene innerhalb des Genoms lautet 3' – N – P – M – F – H – L – 5' (s. Abb. 1.3). Nebst der genetischen Information der viralen Proteine befinden sich zudem nichtkodierende Sequenzen: Am 3'-Ende die *Leader*- und am 5'-Ende die *Trailer-Sequenz*. Sie spielen eine Rolle im Zuge der Enkapsidation und Transkription bzw. Replikation des MV [6]. So erkennt die *RaRp cis-Signale* in *Leader* und *Trailer* und beginnt die Transkription des Plusstranges. Zwischen den einzelnen viralen

Proteinen befinden sich *intergenische Sequenzen (non coding sequences, NCS)*, die ebenfalls nicht für Proteine kodieren. Im Zuge der Replikation, genauer der Transkription des Maserngenomes, kann es hier zu einem Abbruch oder der Entstehung von *polycystrionischen Transkripten* kommen. Untersucht man mit Masernviren infiziertes Gewebe des zentralen Nervensystems (ZNS), wie etwa bei *subakute sklerosierender Panenzephalitis (SSPE)* oder der *Einschlusskörperchenenzephalitis (measles inclusion-body encephalitis, MIBE)* quantitativ auf ihre RNA-Trankripte, so lässt sich ein Gradient feststellen, welcher in Richtung 5' stetig abnimmt [7]. Dieses Phänomen kann jedoch in Zellen, die nicht-neuronalen Ursprungs sind, nicht beobachtet werden. Bis dato wird postuliert, dass dies dem MV dazu verhilft der Immunantwort seines Wirtes zu entgehen und somit entscheidend zur Entstehung der persistierenden Infektionen des ZNS beiträgt [8].

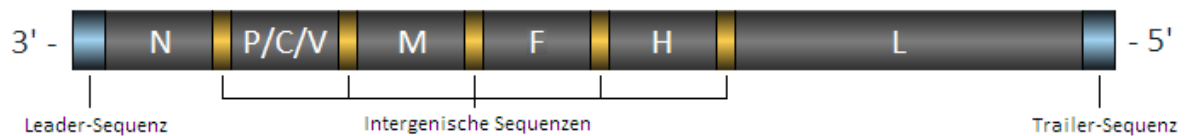


Abb. 1.3 | Genomaufbau des MV

Am 3'- sowie 5'-Ende befinden sich die Leader- und Trailer-Sequenz. Sie umgeben die genetische Information des RNA-Genoms in Form von 6 Strukturgenen, zwischen denen sich die sog. intergenischen Sequenzen befinden.

Jedes Gen des Maserngenoms kodiert für je ein virales Protein. Eine Ausnahme stellt das Gensegment des Proteins P (*Phosphoprotein, 72 kDa*) dar, welches zusätzlich für zwei weitere Nichtstrukturproteine (*C- und V-Protein*) kodiert. Die Expression des **C-Proteins** erfolgt durch die Verschiebung des Leserasters innerhalb der P-mRNA indem die RaRp im Zuge der Transkription ein alternatives Startcodon weiter in Richtung 5'-Ende verwendet [9]. Das **V-Protein** entsteht durch kotranskriptionelles RNA-Editing indem die *RaRp* an Position 751 ein Guanin-Nukleotid inseriert, was zu einer Änderung des Leserasters führt. Vergleicht man die beiden translatierten Proteine P und V miteinander, so liegen

die ersten 230 Aminosäuren vom N-terminalen Ende ausgehend in identischer Reihenfolge vor, unterscheiden sich jedoch im anschließenden weiter carboxyterminalen liegenden Bereich durch einen cystinreichen C-Terminus in der Sequenz des V-Proteins [10]. Im Gegensatz zum P-Protein stellen sie keine Strukturproteine dar, sondern inhibieren die unspezifische bzw. angeborene Immunabwehr (engl. „*innate immunity*“) ihres Wirtes auf unterschiedliche Weise. So führt die Expression des V-Proteins zur Blockade des über *MDA5* (*melanoma-differentiation-associated gene 5*, auch bekannt als *Iflh1* oder *Helicard*) verlaufenden Interferon-Signalweges. *MDA5* besitzt wie *RIG-I* (*retinoic acid-inducible gene 1*) die Fähigkeit virale RNA im Zytoplasma der Wirtszelle zu erkennen [11], was über eine sich anschließende intrazellulär ablaufende Signalkaskade zur Induktion von α - und β -Interferon (*IFN α/β*) führt [12], einer überaus wichtigen Abwehrmaßnahme des Immunsystems bezüglich viraler Infektionen [13]. Zudem ermöglicht die Expression des V-Proteins die Inhibition eines weiteren Signalweges an dessen Ende die Expression von *INF* steht: dem *JAK/STAT-Signalweg* [14; 15; 16]. Im Gegensatz zum V-Protein ist über die genaue Funktion des C-Proteins weitaus weniger bekannt. Gesichert ist, dass in Zellen, die mit einem rekombinanten MV infiziert werden, sowohl Translation als auch Replikation gehemmt werden und es zu einer vergleichsweise stärkeren Induktion von *INF* kommt [17]. Somit besitzt das C-Protein des Masernvirus per se nicht wie das Protein V die Fähigkeit quantitativ in die Expression des Interferons einzugreifen. Jedoch konnte gezeigt werden, dass das C-Protein die Rolle eines Regulators für die virale RNA-Synthese einzunehmen scheint und somit indirekt ebenfalls in die Interferon-Signalkaskade eingreift, da die Expression sowohl des C- als auch des V-Protein nötig sind, um die *INF*-Immunantwort zu umgehen [16].

Das **P-Protein** ist Bestandteil des Nukleokapsids, zu deren Bildung zwei weitere Proteine beitragen: Das *L-Protein* (*Large-Protein*) und das *N-Protein* (*Nukleoprotein*). Das P-Protein besteht aus einer intrinsisch unstrukturierten N-terminalen Region (*PNT*) und einer abwechselnd geordneten und ungeordneten, weiter am C-Terminus, gelegenen Region (*PCT*) [18; 19]. Die PCT kann weiter unterteilt werden in die *PMD* (*P multimerization domain*), welche für die Oligomerisation und Bindung an das L-Protein benötigt wird [20] und weiter in

Richtung C-Terminus (P459–507), die *X-Domäne (XD)*, welche die Bindedomäne für das Nukleokapsid darstellt [21]. Die funktionelle Rolle des Proteins P besteht in der Transaktivierung und Regulation der viralen *RaRp* (L-Protein), sowie dessen Stabilisierung. Die *RaRp* ist nicht funktionsfähig ohne das P-Protein und wird daher als essentieller Kofaktor der Polymerase angesehen [22; 23].

Innerhalb des **N-Proteins** (60 kD), mengenmäßig die Hauptkomponente des Nukleokapsids, können zwei unterschiedliche Domänen bzw. Hälften gefunden werden. N-terminal gelegen befindet sich die stark konservierte Domäne *N_{CORE}* (N1-400) und weiter C-terminal gelegen die Domäne *N_{TAIL}* (N401-525), die phylogenetisch weniger stark konserviert ist [24]. *N_{CORE}* hat einen globulären Aufbau und ist bei Fehlen viraler RNA und anderer viraler Proteine für die Zusammensetzung des N-Proteins zu nukleokapsid-ähnlichen Strukturen mit zellulärer RNA ebenso, wie die eigentliche Bindung an virale RNA, mit darauffolgender Bildung des helikalen Nukleokapsids, verantwortlich [25; 26; 27]. *N_{TAIL}* ist ein monomeres Protein und ragt aus der Oberfläche des Nukleokapsids, was eine Interaktion mit weiteren viralen oder zellulären Partnern ermöglicht [28]. Ebenso können im Zytosol vorkommende Proteine an *N_{TAIL}* gebunden bzw. mit ihm in Interaktion treten. Dies sind das *70kD heat-shock protein (Hsp72)* mit einem möglicherweise verstärkenden Effekt eines Hitzeschocks auf die MV-Replikation und der *Interferon regulatory factor-3 (IRF-3)*, wodurch vermutlich ebenfalls in die *INF*-Synthese eingegriffen werden kann [29; 30]. Durch die Interaktion des N-Proteins mit Rezeptoren auf der Zelloberfläche kann es darüber hinaus aktiv das Immungeschehen des Wirtes beeinflussen. Durch die Bindung an humane und murine *Fc-Rezeptoren des Typs IgG II (FcγRII/CD32)* kann im in vivo-Mausmodell eine verminderte inflammatorische Immunantwort nachgewiesen werden. Diese Inhibition ist mit einer Minderung der antigenspezifischen CD8-T-Zell-Proliferation und einem Abfall von *Interleukin-12 (IL-12)* durch murine *dendritische Zellen (DCs)* vergesellschaftet [31; 32]. In vitro ist zudem die *IL-12*- und Antikörperproduktion in humanen *CD40*-aktivierten DCs und aktivierten B-Lymphozyten nachgewiesen [33; 34]. Ferner kann die *N_{TAIL}*-Domäne über einen bis heute unbekanntem Rezeptor, derzeit bekannt als *Nukleoprotein-Rezeptor (NR)*, an

weitere Zellen des Wirtes binden um eine Verminderung der T-Zell-Proliferation auszulösen [32].

Die dritte Komponente des Nukleoproteinkomplexes (*RNP*) ist das **Largeprotein (L-Protein)**. Es ist mit 2183 Aminosäuren und einem Molekulargewicht von 248 kDa auch das größte aller exprimierten Masernproteine [35]. Wie bereits beschrieben ist sie die eigentlich katalytisch aktive *RaRp*, die nur in Verbindung mit den beiden anderen Proteinen des Nukleoproteinkomplexes, dem N- und P-Protein, aktiv sein kann. Neben der Funktion als Polymerase hat es auch Capping- und Methylierungsfunktionen an 5'-Enden. Darüber hinaus ist es für die Polyadenylierung an den 3'-Enden der gebildeten mRNAs verantwortlich [22]

Das Matrixprotein (M-Protein, 37 kD) des MV wird zu den peripheren Membranproteinen gezählt, ist basisch und aus 335 Aminosäuren aufgebaut [36]. Nach der Translation im Zytoplasma, bindet es kurz darauf an zelluläre Membranen ohne dass eine Kolokalisation mit den viralen Transmembranproteinen von Nöten ist. Somit ist die Bindung dieses viralen Proteins an Plasmamembranen eher als dessen intrinsische Eigenschaft anzusehen [37]. Durch die Bindung an den zytoplasmatischen Anteil in der Membran gelegenen *Glykoproteinen F (Fusionsprotein)* und *H (Hämagglutinin)* auf der einen [38; 39] und dem N-Protein und somit dem *RNP* auf der anderen Seite [3], stellt es eine Art Bindeglied zwischen der Plasmamembran des Virions und dem *RNP* dar. Durch die Bindung des M-Proteins an die Glykoproteine wird eine Abschwächung bzw. Regulation der durch diese beiden Proteine initiierte Zellfusion mit anschließender Synzytienbildung erreicht [40; 41]. Kommt es dagegen zu einer verminderterten Expression des Matrixproteins *in vitro*, beispielsweise durch Effekte der *RNAi*, nimmt die Rate an Zellfusionen unter den infizierten Zellen und die Expression von viralen, sowie genomischen mRNAs um den Faktor 2 bis 2,5 zu [42], was die Vermutung stützt, dass das M-Protein in einer weiteren Funktion die Rolle eines Regulators bezüglich der Aktivität der viralen Polymerase innehat [43]. Auf die Rolle des M-Proteins bezüglich Morphogenese und Ausschleusung von Viruspartikeln wird ausführlicher in Kap. 1.1.4.3 eingegangen. Schon seit längerem wird darüber hinaus vermutet, dass mutierte MV-varianten, in diversen Veröffentlichungen auch als *SSPE-Viren* bekannt, für die Entstehung der

subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE) verantwortlich sind. So entdeckte man in Biopsiematerialien von an *SSPE* Erkrankten neben Mutationen im Bereich des Hämagglutinin-, Nukleokapsid- und des Fusions-Gens hauptsächlich Mutationen des Matrix-Gens. Man schreibt ihm daher eine zentrale Rolle in der Entstehung dieser auf Masernviren basierenden persistierenden Virusinfektion zu [43; 44; 45].

Die beiden Transmembranproteine des MV sind das **Hämagglutinin (H-Protein, 80kDa)** und das **Fusionsprotein (F-Protein)**. Das F-Protein ist nahe seines Carboxyterminus (*Typ I-Glykoprotein*) und das H-Protein (*Typ II-Glykoprotein*) nahe des Aminoterminus mit Plasmamembranen verankert [4] und stehen sowohl physikalisch als auch funktionell mit dem Matrixprotein in Verbindung [46]. Das H-Protein ist für die Adsorption an die zellulären Rezeptoren des MV einer Wirtszelle (*CD46, CD150*) zuständig [3]. Auf der Hülle des MV oder auf infizierten Zellen erscheint es als Tetramer aus zwei kovalent miteinander verbundenen Dimeren [47]. Sobald die Bindung an die Zelle erfolgt ist, wird die Fusion der Membranen von Virion und Wirtszelle durch das F-Protein eingeleitet. Für die Infektiosität des MV ist daher die Doppelsexpression beider Proteine von essentieller Bedeutung, weswegen das H-Protein auch als Kofaktors der MV-induzierten Membranfusionen angesehen wird [48]. Das F-Protein selbst, wird als inaktives Vorgängermolekül (F_0 ; 60 kDa) intrazellulär synthetisiert. Während des Transports an die Zelloberfläche wird es mittels der Endoprotease Furin intrazellulär verdaut, wodurch die zwei Polypeptiduntereinheiten F_1 (40 kDa) und F_2 (18 kDa) entstehen, die jedoch weiterhin über eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind. Dieser Vorgang findet in der trans-Golgi-Zisterne oder dem *trans-Golgi-Netzwerk (TGN)* der Zelle statt [49; 50]. Der F_1/F_2 -Komplex wird in Form eines Trimers in die Plasmamembran der infizierten Wirtszelle und des Viruspartikels eingebaut. Beim Fusionsprozess löst die Interaktion des H-Proteins mit dessen zellulären Rezeptoren eine Konformationsänderung des F-Proteins aus, in dessen Folge es mit seinem Fusionspeptid (hydrophober Bereich am N-Terminus von F_1) an die Membran der nicht-infizierten Zelle bindet. Nachfolgend kommt es dann zur Membranfusion [51].

1.1.4 Vermehrungszyklus des Masernvirus

1.1.4.1 Adsorption und Penetration

Erster Schritt der Infektion ist der Kontakt bzw. die Adsorption des Viruspartikels mit der Wirtszelle. Dies ist ein statistisches Ereignis ohne chemotaktische Grundlage. Den Anfang des Vermehrungszyklus markiert die Bindung des viralen Hämagglutinins an einen vom MV erkannten Rezeptor (s.o.). Erster als solcher erkannter Rezeptor für Masernviren war *CD46* (*CD = Cluster of differentiation*) [52]. *CD46* wird von allen kernhaltigen Zellen auf deren Oberfläche exprimiert. Eine Besonderheit ist, dass er hauptsächlich von attenuierten MV-Stämmen oder Masernviren, die auf Vero-Zellen spezialisiert sind, nicht jedoch vom *MV-Wildtyp* (*MVwt*) erkannt wird. An *CD46* können zudem die Faktoren des Komplementsystems, *C3b* und *C4b*, binden, was einer Inhibition der Aktivierung des Komplementsystems gleichkommt und als dessen Folge die Anlagerung des lytischen Komplexes (Membranangriffskomplex) erschwert wird [53]. Bindet das H-Protein des MV an diesen Rezeptor führt dies zu einer Herabregulation von *CD46* von der Zelloberfläche und dadurch zu einer vermehrten Lyse der infizierten Zellen durch das Komplementsystem [54; 55]. Ein weiterer Rezeptor, den sämtliche uns bekannten MV-Stämme verwenden, stellt *CD150/SLAM* (*signalling lymphocytic activation molecule*) dar. Er ist Mitglied der *CD2*-Untergruppe der Ig Superfamilie, welcher auf den Oberflächen aktivierter T-Zellen, unreifen Thymozyten, Gedächtnis-T-Zellen und aktivierten B-Zellen gefunden werden kann [56; 57; 58; 59]. *MVwt*, die bekanntlich nicht *CD46* als Rezeptor nutzen, sind allerdings in der Lage *CD46⁺/SLAM-Zellen* (z.B. *HBMECs* oder *HUVECs*) zu infizieren. Selbst durch eine Blockade des *CD46*-Rezeptors mittels Antikörpern führt zu einer Infektion dieser Zellen. Es wurde daher postuliert, dass es neben *CD46* und *CD150* noch einen weiteren zellulären Rezeptor geben muss, den das MV für seine Adsorption verwendet [60]. Im Jahre 2011 wurde mit *Nectin-4* ein weiterer Rezeptor des MV unter den Epithelzellen ausfindig gemacht [61, 62]. Eine Besonderheit diesen Rezeptor betreffend ist die Tatsache, dass *Nectin-4* in der klinischen Medizin bereits als Tumormarker für Brust-, Lungen- und Ovarial-*CAs* bekannt ist und auch vermehrt von Colon-*CAs* synthetisiert wird. Durch eine

Infektion dieser Zellen mit dem MV und ihrer nachfolgend virusbedingten Zytolyse wird das Virus in den letzten Monaten wieder vermehrt als potentielles Agens bezüglich seiner onkolytischen Wirkung und eines möglichen therapeutischen Einsatzes hoch gehandelt. Mit der Bindung des H-Proteins an einen der zellulären Rezeptoren erfolgt eine Konformationsänderung des oligomeren *H/F-Komplexes*. In der Folge verschmelzen virale Hüllmembran und Plasmamembran der Wirtszelle und die genetische Information des MV kann in Form des Nukleokapsids in die Wirtszelle gelangen [48; 63; 64].

1.1.4.2 Uncoating und Replikation

Penetration und Uncoating gehen nahtlos ineinander über. Nach der Penetration zerfällt das Nukleokapsid und die virale RNA wird im Zytoplasma freigesetzt. Nun kann im Zytoplasma der Wirtszelle die Transkription subgenomischer viraler RNA durch den viralen *RNP* beginnen. Die am 3'-Ende befindliche Leader-Sequenz dient der viralen Polymerase als Promotor, die nun aus der negativsträngigen RNA positivsträngige RNA-Transkripte herstellen kann [65; 6]. Auf Grund des in Kap. 1.1.3 beschriebenen Abfallens der Polymerase im Bereich der intergenischen Sequenzen resultiert ein Gradient bezüglich der Quantität einzelner RNA-Transkripte. Übersteigt die Menge an freiem N-Protein im Zytosol einen Schwellenwert, stoppt die *RaRp* die Transkription und beginnt mit der Replikation des Maserngenoms. So wird die Leader-Sequenz durch das N-Protein enkapsidiert, mit der Folge, dass die virale *RaRp* STOP-Signale innerhalb der intergenischen Sequenzen überliest und ein vollständiges, positivsträngiges MV-Genom entsteht [66; 67; 68]. Aus dem so generierten Plusstrang können nun in einem nächsten Schritt Maserngenome mit negativer Orientierung transkribiert werden. Die bereits während der Transkription synthetisierten viralen Oberflächenproteine F und H werden in die Membran ihrer Wirtszelle eingebaut. Durch ihre Expression an der Zelloberfläche können sie mit den *CD46*- oder *SLAM-Rezeptoren* der benachbarten Zellen in Wechselwirkung treten. Die Folge ist neben der Fusion mit Nachbarzellen und die somit entstehende Synzytienbildung auch der Übertritt des Nukleokapsids und damit die Infektion dieser Zellen ohne vorherige Lyse. Parallel treten die zytoplasmatischen Domänen der Proteine F und H in Kontakt mit den

Matrixproteinen im Zytoplasma. Durch gegenseitige Bindung kleiden sie die Innenseite der Zellmembran aus und bereiten so die Knospung mit darauffolgender Ausschleusung der neuen MV-Partikel vor.

1.1.4.3 Morphogenese und Ausschleusung

Erster Schritt für Knospung (*Budding*) und Ausschleusung des MV innerhalb der Wirtszelle ist der Transport des *RNP* an die Zellmembran der Wirtszelle. Hierfür ist die Expression mit nachfolgendem Transport des M-Proteins zu den zytoplasmatischen Domänen der viralen Oberflächenproteine an der Innenseite der Plasmamembran nötig. Man nimmt an, dass die im Zytoplasma als Einschlusskörperchen vorliegenden *RNPs* zusammen mit dem M-Protein in Richtung Zelloberfläche befördert werden [69]. Dort treten dann die Matrixproteine mit zytoplasmatischen Anteilen der bereits synthetisierten H/F_{1/2}-Trimeren in Kontakt und bilden eine submembranöse Matrixschicht. Das Virus wird freigesetzt, indem sich das *RNP* und das M-Protein, mitsamt der Plasmamembran und den darin enthaltenen Glykoproteinen von der Wirtszelle abschnüren oder diese vollständig lysiert wird. Im Falle der Paramyxoviren folgen die viralen Glykoproteine H und F häufig intrinsischen Signalen, die deren Verteilung auf den basolateralen oder apikalen Zellpol regulieren. Bei Masernviren werden jedoch nicht ihnen, sondern dem M-Protein, diese Rolle zugesprochen: So finden sich bei polarisierten Zellen bei alleiniger Expression der Proteine H und F diese vorwiegend basolateral. Dagegen werden einerseits im Rahmen einer Infektion beide Glykoproteine hauptsächlich auf der apikalen Zelloberfläche exprimiert. Zum Anderen werden sie, falls die Infektion mit einem rekombinanten MV erfolgte, dessen Gen für das Matrixprotein deletiert wurde, in weitaus geringerem Maße auf der apikalen Seite exprimiert [70; 71; 72]. Das Virus macht sich die apikale Ausschleusung im Zuge der aerogenen Transmission auf einen neuen Wirt zunutze indem es die Virionen aus Epithelzellen der Atemwege in den Extrazellulärraum, genauer dem Tracheallumen, ausschleust [73; 71]. Eine Ausnahme stellen jedoch mit MV infizierte Endothelzellen dar. Um Infektionen verschiedener Organe wie beispielsweise Haut oder ZNS auszulösen, muss hierfür die Endothelzellbarriere der Blutgefäße durchbrochen werden. Diesbezüglich

konnte nachgewiesen werden, dass bei infizierten Endothelzellen auch ein basolaterales Ausschleusen von Viruspartikeln möglich ist [74].

1.2 Masern

1.2.1 Bedeutung und Epidemiologie

1.2.1.1 Bedeutung

Die Masern (*lat. Morbilli*) sind eine hochansteckende (Kontagionsindex von 0,95) Infektionserkrankung mit weltweiter Verbreitung von der typischerweise Kinder betroffen sind. Die Übertragung erfolgt auf aerogenem Weg durch Tröpfcheninfektion [75]. Sind im Falle einer Manifestation schwerwiegende Komplikationen in Industrienationen eher selten, stellen sie jedoch in Entwicklungsländern, oft durch Faktoren wie Mangelernährung eine ernsthafte Gefahr mit hoher Mortalität für die betroffenen Kinder dar. Der Mensch gilt für das Virus als natürliches und einziges Erregerreservoir, wobei anzumerken ist, dass auch einige Primaten nach Inkorporation der Viren an Masern erkranken können [76]. Diese Tatsache und die geringe genomische Variabilität der Masernviren lassen dessen Ausrottung etwa durch Impfkampagnen, wie es bereits bei Pockenviren der Fall war, möglich erscheinen.

1.2.1.2 Epidemiologie

1954 konnte das Virus erstmalig von *John Enders* und *Thomas Peebles* isoliert werden. Nachfolgend stand 1958 der erste attenuierte Lebendimpfstoff zur Verfügung, welcher 1963 auch der breiten Bevölkerung verimpft werden konnte [77; 78; 79]. Vor Einführung der Impfungen verursachten die Masern jährlich weltweit ca. 5 bis 8 Millionen Todesopfer. In entwickelten Ländern trug neben Verbesserungen in puncto Ernährung, ökonomischer Entwicklung, medizinischer Versorgung und dem vereinfachten Zugang zu Medikamenten wie Antibiotika (im Falle der Behandlung einer sekundär bei Masern auftretenden bakteriellen Pneumonie) in erster Linie die Einführung des Impfstoffes und dessen Verimpfung deutlich zur weltweiten Senkung der masernassoziierten Mortalität bei. Im Jahre 2001 starteten die *WHO* und *UNICEF* mit weiteren Partnern wie etwa dem *Roten Kreuz* die „*Measles Initiative*“ [80]. Ziel war es, die Schutzimpfung gegen Masern flächendeckend einzuführen und die Durchführbarkeit einer globalen Eradikation

des Virus zu bewerten [81]. Die eigentliche Reduktion der weltweit registrierten Erkrankungen in den darauffolgenden Jahren war beträchtlich. So wurden 1980 noch über 4 Millionen Masernodesfälle registriert. Zehn Jahre später, im Jahre 1990, sank die bis dato stetig abnehmende Anzahl der an Masern Verstorbenen weiter auf 1 374 083 Personen. Schon 2005 wurden an die *WHO* nur noch 580 287 Todesfälle gemeldet. Die derzeit aktuellsten Zahlen aus dem Jahr 2010 belaufen sich auf 306 131 Sterbefälle, was jedoch einen Wiederanstieg verglichen mit den Jahren zuvor bedeutet (2009: 208 964 Todefälle; 2008: 164 000 Todesfälle) [82; 83]. Die Zukunft wird zeigen, ob die Zahl der Krankheitsfälle noch weiter reduziert werden kann oder die Anzahl an Erkrankten auf diesem Niveau stagnieren oder gar ansteigen wird.

Auf Grund der hohen Kontagiosität des MV müssen innerhalb der Bevölkerung Durchimpfungsraten von ca. 95% erzielt werden um die Herdenimmunität zum Schutze der Gesamtpopulation sicherzustellen. Besonders Entwicklungsländer sind mit Problemen konfrontiert, die sie an der Erfüllung dieses Zieles hindern. Bezüglich der Anwendung des Impfstoffes müssen nötige Rahmenbedingungen personeller und logistischer Art, wie etwa der Aufrechterhaltung einer Kühlkette während des Transportes des hitzelabilen Masernimpfstoffes, sichergestellt werden [84]. Dieses Problem könnte zukünftig durch die derzeit vorangetriebene Entwicklung eines Inhalationsimpfstoffes umgangen werden. Erste Ergebnisse einer in-vivo-Testung in der Verabreichung des Impfstoffes an Rhesusaffen zeigen bereits vielversprechende Ergebnisse [85]. In den letzten Jahren musste der Zeitpunkt für die Eradikation des Virus seitens der *WHO* immer wieder verschoben werden: Im Jahre 2000 um weitere 10 Jahre und nun, im Jahre 2010 auf das Jahr 2015 [86]. Ob das gegenwärtige Ziel der Eradikation in 5 Jahren umgesetzt werden kann, bleibt abzuwarten. Dass eine Eradikation innerhalb nationalem Niveau möglich ist, zeigten die Finnen bereits in der Vergangenheit. Finnland war es als erstes Land im Jahre 2006 möglich die Masern auf nationalem Niveau zu eradizieren [87]. Ein Ziel, dem viele der entwickelten Länder, insbesondere in Europa, hinterherhinken. Grund hierfür sind neben einer allgemeinen Impfmüdigkeit auch Überzeugungen und Einstellungen verschiedener Bevölkerungsgruppen und Religionsgemeinschaften, die immer

wieder lokal begrenzten Masernausbrüchen zur Folge haben [eine aktuelle Auswahl: 88; 89; 90; 91].

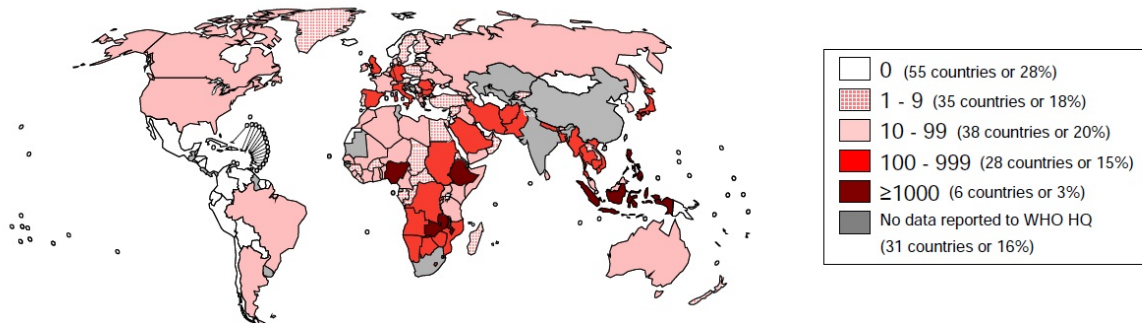


Abb. 1.4 | Übersicht der weltweiten Maserninzidenz im Zeitraum von Juli 2010 bis Januar 2011 (Quelle: Measles Surveillance Data, WHO 2011)

Auf die Bundesrepublik Deutschland (*BRD*) bezogen gab es den letzten großen Masernausbruch im Jahre 2006 mit ca. 614 Fällen in Duisburg [92]. Die derzeit aktuellsten Zahlen bezüglich Masernerkrankungen in der BRD stammen aus dem Jahre 2010 mit 777 registrierten Erkrankungsfälle innerhalb eines Jahres seitens des Robert Koch-Instituts (*RKI*) [93]. In der Zusammenschau der ans *RKI* gemeldeten Fälle in den Jahren zuvor erkennt man ein Einpendeln der Fallzahlen auf ein konstantes Niveau, das sich zwischen 500 und 900 erkrankten Personen pro Jahr bewegt (s. Abb. 1.5).

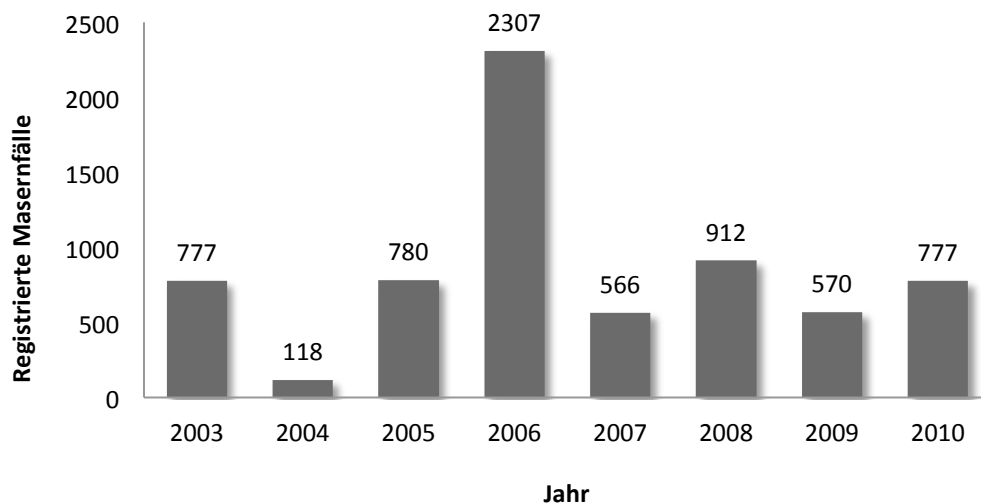


Abb. 1.5 | In der BRD registrierte Masernfälle von 2003 bis 2010
(Quelle: RKI, Epidemiologisches Bulletin Nr. 3 der Jahre 2011 bis 2004)

1.2.2 Pathogenese

Wie bereits beschrieben erfolgt die Übertragung via Tröpfcheninfektion indem das Virus über den Respirationstrakt, seltener über die Bindehaut des Auges in den Körper des Wirtes gelangt. Bisher ging man davon aus, dass Masernviren nach der Inkorporation die Epithelzellen des oberen und unteren Respirationstraktes infizieren um sich anschließend in diesen zu replizieren. Von dort ausgehend wird das Virus mittels infizierter Makrophagen in die benachbarten drainierenden Lymphknoten des Kopf-Hals-, Mediastinal- und Thoraxbereiches transportiert. Hier angekommen infizierten die Viren hier befindliche Monozyten, die sich im Folgenden über die Blutbahn, in der ersten virämischen Phase, im gesamten Körper ausbreiten können. Unter anderem auf das gesamte retikuloendotheliale System, insbesondere weiterer Lymphknoten und der Milz des Wirtes [94; 95]. Infizierte Zellen des lymphatischen Gewebes und auch des Respirationstraktes wandeln sich post infectionem in Riesenzellen mit eosinophilen Einschlusskörperchen im Zytoplasma um, den sog. *Warthin-Finkeldey-Zellen*. In einer sich daran anschließenden zweiten virämischen Phase infiziert das Virus Zellen verschiedenster Gewebetypen, wie beispielsweise Haut und Schleimhäute, Zellen des Gastrointestinaltraktes, Nervenzellen, etc..

Neuere Versuche an Macaquen zeigen jedoch, dass Lymphozyten und dendritischen Zellen (*DCs*) eine wohl weitaus größere Bedeutung in der Pathogenese haben als bisher angenommen: Weder Epithelzellen noch nicht-aktivierte Monozyten exprimieren den Rezeptor *CD150/SLAM*, den wohl wichtigsten Rezeptor in Bezug auf Adsorption für *MVwt*, nicht auf ihrer Zelloberfläche. Auf Grund der Tatsache, dass das *MV* hochinfektiös ist, wäre es demnach naheliegend, wenn gerade diese Zellen, am Anfang der Infektionskette stehend, mit Rezeptoren ausgestattet sind, die eine hohe Affinität zum *MVwt* haben. Dagegen tragen Subpopulationen von Thymozyten, Makrophagen, *DCs* und aktivierte B- und T-Lymphozyten *CD150* auf ihrer Oberfläche [56; 96] und machen sie für das Ziel der Masernviren am Beginn der Infektionskette weitaus wahrscheinlicher. Gerade B- und T-Lymphozyten lassen sich sehr gut *in vivo* und *in vitro* mit *MV* infizieren [97; 98]. Studien mit Makaken belegen, dass B- und T-Lymphozyten, insbesondere T-Gedächtniszellen (*CD45RA*-), Hauptziele der *MV*-Infektion darstellen. Dagegen konnte eine Infektion der Monozyten praktisch nicht nachgewiesen werden [99]. Dies legt die Vermutung nahe, dass sich nicht Monozyten, sondern Lymphozyten in der virämischen Phase im Körper des Wirtes verteilen [99]. Ebenso scheinen dendritische Zellen, welche ebenfalls den Rezeptor *CD150* exprimieren, eine wichtige Stellung im Zuge der Pathogenese der Masern einzunehmen. So fanden sich in infizierten Primaten *MHC-Klasse-II⁺ CD11c⁺ DCs* in der Submukosa des Respirations- und Gastrointestinaltrakts und in Zellen der Dermis. In neueren *in vivo*-Studien an Macaquen konnte zudem nachgewiesen werden, dass infizierte *DCs* assoziiert an lymphatisches Gewebe, Haarfollikeln und mukösen Drüsen vorlagen [100]. Dagegen scheinen heute, die bisher geglaubten Primärzellen der Infektion, den Epithelzellen, eine eher nebensächliche Rolle zu spielen. Vermutungen legen eher eine Infektion dieser Zellen durch bereits infizierte Lymphozyten von basolateral über einen bisher nicht näher bestimmten Epithelzellrezeptor (*EpR*) nahe und nicht wie bisher angenommen deren Infektion von apikal [101; 102].

1.2.3 Klinik

Die Masern gelten als hochansteckend und betreffen in erster Linie Kinder. Infektionen von seronegativen Erwachsenen kommen zwar vor, stellen jedoch eher die Ausnahme dar. Die Inkubationszeit beträgt ca. 2 Wochen. Es folgt das Prodromalstadium in dem die Patienten bereits Viren ausscheiden und dementsprechend als infektiös anzusehen sind. Gekennzeichnet durch eine katarrhalischen Symptomatik, entwickeln sie eine Entzündung der oberen Atemwege mit Rhinitis, Pharyngitis, Laryngitis, Tracheitis und Bronchitis, verbunden mit einem Temperaturanstieg auf über 39 °C und bellendem Husten. Zusätzliche Teilsymptome können eine Blepharitis, sowie Konjunktivitis verbunden mit Lichtscheue sein (s. Abb. 1.6 C). Obwohl die Patienten ein typisches klinisches Bild bieten wird jedoch die Diagnose einer Maserninfektion häufig erst nach dem Ausbruch des typischen großflächigen, konfluierenden Exanthems (s. Abb. 1.6, A) gestellt [103; 75]. Am 2. oder 3. Tag des Prodromalstadiums treten die für die Erkrankung typischen Enantheme an der Mundschleimhaut im Bereich der Prämolaren auf. Nach ihrem Erstbeschreiber, dem US-amerikanischen Kinderarzt *Henry Koplik* (1858-1927), werden sie als Koplikflecken (*engl.: Koplik's spots*) bezeichnet, welcher dies bereits 1896 postulierte [104]. Sie treten bei 60 – 70% aller Infizierten auf und gelten als pathognomonisch für die Erkrankung [105]. Neben ihrem Auftreten an Wangenschleimhäuten sind Koplikflecken zudem an Konjunktiven, sowie Vaginalschleimhaut beschrieben [106]. Die Maximalform ist eine Ausbreitung auf die gesamte Schleimhaut von Wangen und gelegentlich auch der Lippen mit dichtstehenden weißen Effloreszenzen, welche ihr ein „kalkspritzerartiges“ Aussehen verleiht. Sie lassen sich mit dem Spatel nicht abwischen und sind bis zum 2. Tag nach Ausbruch des Exanthems nachweisbar [103].

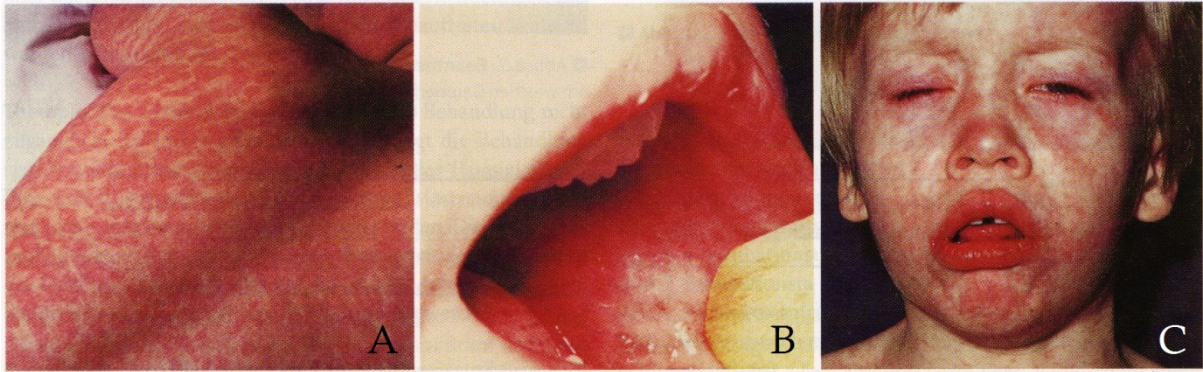


Abb. 1.6 | Klinisches Bild der Masernvirusinfektion (entnommen aus [103])

A Masernexanthem am Rücken eines Kindes zu sehen. Morphologie: leicht erhaben, großfleckig und konfluierend. **B** Koplikflecken der Wangenschleimhaut im Bereich der Prämolaren. **C** Mit MV-Infektion assoziierten Blepharitis

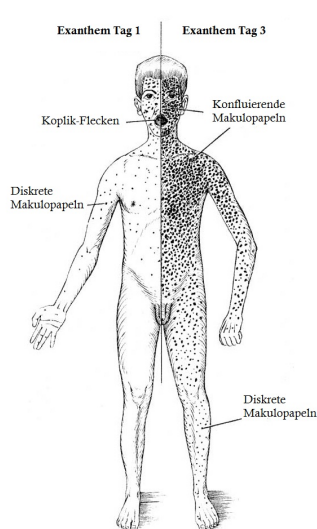


Abb. 1.7 | Erscheinungsbild des Masernexanths im Verlauf der Infektion (in abgeänderter Form aus [120])

Zu sehen ist die unterschiedliche Verteilung der Makulopapeln während des zeitlichen Verlaufs einer MV-Infektion. Zu Beginn sind diskrete, vereinzelt Makulopapeln zu erkennen, welche im Verlauf der Infektion, unter Betonung des Körperstammes, generalisiert auftreten.

Der Ausbruch des makulopapulösen Masernexanths markiert den Beginn des Exanthemstadiums. Primärdilektionsstelle ist der Kopfbereich hinter den Ohren, von wo aus es sich kraniokaudal auf den gesamten Körper, beginnend mit dem Rumpf und anschließend auf Arme und Beine, ausbreitet (s. Abb. 1.7). Die Maculae sind 3-6 mm groß, neigen zu Konfluieren und sind leicht erhaben und werden daher auch als Makulopapeln bezeichnet. Das Exanthem weist zu Beginn ein eher hellrotes Kolorit auf, das im weiteren Verlauf dunkler wird und gegen Ende des Exanthemstadiums einen Stich ins Bläuliche hat. Simultan mit dem

Ausbruch des Exanthems kommt es bei Betroffenen zu einem erneuten Fieberschub. Während dieser Periode verspüren die Kinder ein deutliches Krankheitsgefühl, sind weinerlich, appetitlos und teilweise apathisch. Weiterhin bestehen die bereits im Prodromalstadium aufgetretene Tracheobronchitis, Laryngitis und Konjunktivitis. Die Halslymphknoten sind vergrößert, gelegentlich wird auch eine Splenomegalie festgestellt. Darüber hinaus können weitere Organe bzw. Organsysteme in Mitleidenschaft gezogen werden (s. Abschnitt Komplikationen). Nach dem 3. Tag des Exanthemausbruchs bildet sich das Exanthem in derselben Reihenfolge zurück, in der es gekommen ist. Simultan fällt auch das Fieber und erreicht bis zum Ende des Exanthemstadiums wieder physiologische Werte. Gelegentlich sind bis zu 2 Wochen später bräunliche Flecken auf der Haut der Erkrankten zu erkennen, bevor es zur Restitutio ad integrum kommt.

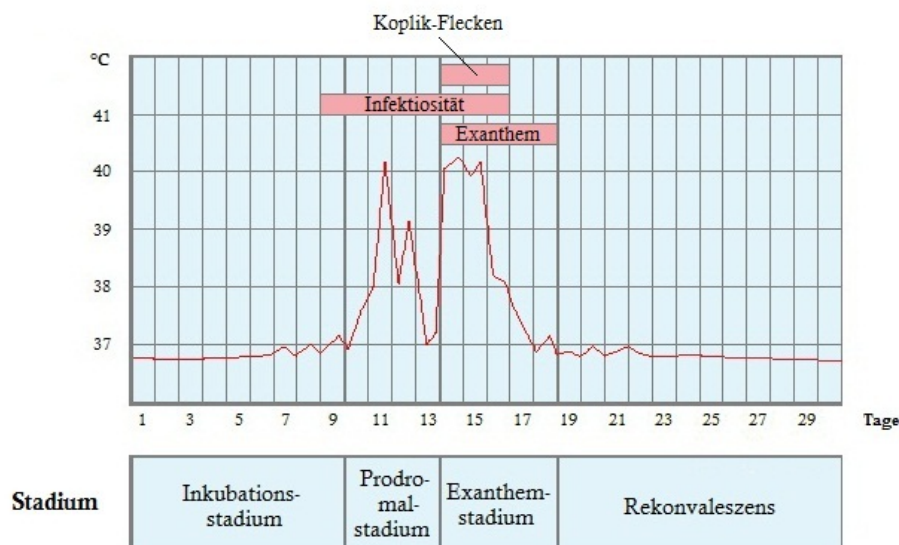


Abb. 1.8 | Verlauf und Stadien der akuten Masern

Abweichende Verlaufsformen sind ebenfalls beschrieben. Normalerweise werden Säuglinge durch die diaplazentar übertragenen Antikörper vor einer Infektion geschützt, dem sogenannten „Nestschutz“ [107]. Wurde bei Schwangeren im Vorfeld keine Schutzimpfung durchgeführt, bzw. waren sie im Laufe ihres

Lebens nicht an Masern erkrankt, verfügen sie über keine ausreichende Immunität in Form schützender Antikörper gegen das MV. In diesem Falle kann es zum Ausbruch der Erkrankung bei jungen Säuglingen, gar Neugeborenen kommen. Zudem werden abgeschwächte Krankheitsverläufe (*mitigierte Masern*) bei Abklingen des Nestschutzes oder wenn in kurzem Abstand vor oder nach einer Masernvireninfektion Antikörper verabreicht wurden, beobachtet. Interessanterweise scheinen Personen mit einem inapparenten, bzw. subklinischen Krankheitsverlauf nicht infektiös zu sein [108]. Unter *hämorrhagischen Masern* versteht man die Ausbildung eines hämorrhagischen Exanthems, bei ansonsten gutartigem klinischen Verlauf. Die sogenannten *weißen Masern* entstehen bei Patienten mit schwerer T-Zell-Insuffizienz, hier kann das charakteristische Masernexanthem völlig fehlen. Die Betroffenen versterben hierbei meist an einer Riesenzellpneumonie. *Atypische Masern* sind heute kaum mehr zu beobachten. Sie traten nach Impfungen bei Kindern in den USA in den Jahren 1963 bis 1968 auf, als ein formalinaktivierter Impfstoff verwendet wurde [109]. Charakteristisch waren distal an den Extremitäten beginnende papulöse Exantheme und die Ausbildung hartnäckiger Pneumonien mit metastasenähnlichen Rundherden, verbunden mit Fieber [110; 111]. Versuche an Macaquen weisen darauf hin, dass Antigen-Antikörper-Komplexe, als Ursache einer ungenügenden Reifung von Antikörperantwort, dafür verantwortlich zu sein scheinen [112; 113].

1.2.3.1 Komplikationen einer Masernvirusinfektion

Das MV besitzt die Fähigkeit verschiedene Zelltypen und damit verschiedene Organsysteme des menschlichen Körpers zu befallen. Darunter Epithelien, retikuloendotheliale Zellen und weiße Blutzellen. Infizierte Zellen von Menschen die in Folge einer Masernvirusinfektion verstarben, zeigten in entnommen Gewebebiopsien aus Gastrointestinal-, Respirationstrakt und lymphatischem Gewebe die typischen *Warthin-Finkeldey-Zellen* [114; 115; 116; 117; 118]. Eine Infektion mit Masernviren führt zudem zu einer ausgeprägten Lymphopenie, genauer einem starken Abfall der *CD4⁺*- und *CD8⁺-Lymphozyten*. Die Lymphopenie beginnt vor dem Ausbruch des Masernexanthems und hält ca. 1 Monat lang an

[119]. Während dieses Zeitraums können auch Hauttests, bei denen Fremdantigene inokuliert werden, negativ ausfallen. Die Betroffenen sind dadurch erheblich immunkompromittiert, was eine erhöhte Suszeptibilität für opportunistische Infektionen und einer dadurch bedingten Steigerung der Letalität zur Folge hat. Weitere, auf ein spezifisches Organsystem, bezogene Komplikationen sind im Folgenden aufgelistet.

Otitis media. Sie stellt eine der häufigsten masernvirusassoziierten Komplikationen dar. Man nimmt an, dass es im Zuge der Inflammationsreaktion des respiratorischen Epithels zu einer Obstruktion der Tuba *auditiva (Tuba eustachii)* und sekundär zu einer bakteriellen Infektion kommt [120].

Laryngotracheobronchitis. Die auch als „Masernkrupp“ bezeichnete Laryngotracheobronchitis kommt häufig bei Kindern unter 2 Jahren vor. Durch die Entzündung des Larynx dem damit resultierendem Anschwellen der Schleimhaut, stehen Symptome wie Heiserkeit und Dyspnoe im Vordergrund. Wie bei der Otitis Media ist eine bakterielle Sekundärinfektion häufig [120].

Pneumonie. Sie ist die häufigste der schwer verlaufenden Komplikation einer MV-Infektion und für die meisten masernvirusassoziierten Todesfälle verantwortlich. Die Pneumonien, können alleinig durch MV, sekundäre Virusinfektionen, beispielsweise mit *HSV* oder Adenoviren oder aber durch sekundäre bakterielle Infektionen verursacht werden [120]. Darüber hinaus ist die Masernvirusinfektion eine mögliche Ursache der Hecht'schen Riesenzellpneumonie, die üblicherweise vorrangig in immunkompromitierten Personen vorkommt. Ihre Prognose ist schlecht [118].

Diarrhoe. Wie bereits in Kapitel 1.2.2 beschrieben besitzen Masernviren die Fähigkeit bestimmte Zellen des Gastrointestinaltraktes zu infizieren. Dies wurde durch Immunfluoreszenzfärbungen aus entnommenen Gewebeproben (Magen und Appendix) belegt [121; 122]. Die Diarrhoesyndromatik beginnt vor dem Auftreten der maserntypischen Hauteffloreszenzen. Es wird angenommen, dass ätiologisch alleinig das Virus verantwortlich zu sein scheint, dass jedoch zusätzlich bakterielle oder virale Infektion zur Schwere und Dauer dieser Symptomatik beitragen [123].

Konjunktivitis. Eine ebenfalls relativ häufige Komplikation. Zusätzlich kann die Infektion auch auf die Kornea übergreifen [124]. Normalerweise heilt die Konjunktivitis komplikationslos aus. Jedoch sind Fälle bekannt, in denen bakterielle oder virale Superinfektionen zu Ulzerationen der Kornea bis hin zur Blindheit der Betroffenen geführt haben sollen. Ein Mangel an Vitamin A, eher häufig in schwächer entwickelten Ländern, prädisponiert zur Entstehung einer Keratitis und der möglichen Folge einer Narbenbildung im Bereich der Kornea [125; 126].

Weitere Erkrankungen, die mit Masernviren in Verbindung gebracht werden:

Multiple Sklerose (MS) und die MSMV-Hypothese. Es ist bekannt, dass im Verlauf einer MS sich oligoklonale Banden aus dem Liquor cerebrospinalis der Betroffenen nachweisen lassen, ein Befund der eigentlich für eine Infektion innerhalb des ZNS entspricht [127; 128]. Hierbei werden häufig neben Röteln- und Varizella zoster-Antikörpern, sehr hohe MV-Antikörpertiter gefunden („MRZ-Reaktion“) [129]. In der Vergangenheit wurde ätiologisch auch ein morbilliformes bzw. masernähnliches Virus als mögliches pathogenes Agens vermutet [130]. Jedoch konnte bis zum heutigen Tag kein virales Agens aus Hirngewebe von MS-Patienten isoliert werden [131; 132].

Otosklerose: Patienten, die an Otosklerose erkrankt sind, weisen im Gewebe der Gehörknöchelchen und Osteoklasten eine verstärkte Expression des Oberflächenrezeptors *CD46* auf. Zudem ließen sich an den Foci *MV-RNA* durch *RT-PCR* nachweisen [133]. So wird heute von einer starken Verbindung zwischen einer Infektion mit Masernviren und der Entstehung von Otosklerose ausgegangen [134].

Zu Komplikationen einer Masernimpfung wird näher in Kapitel 1.2.5 eingegangen.

1.2.3.2 Neurologische Komplikationen einer Masernvirusinfektion

Nach den akuten Masern können Komplikationen innerhalb des ZNS zu verschiedenen Zeitpunkten auftreten und werden neben ihrem

histomorphologischen Bild auch diesbezüglich eingeteilt [135]. Eine recht früh auftretende Form stellt die *para- oder postinfektiöse Masernenzephalitis (APME)* dar. Sie entwickelt sich entweder gleichzeitig oder eine Woche nach Auftreten des maserntypischen Exanthems. Sie ist die häufigste Form aller das ZNS betreffenden MV-assoziierten Komplikationen (ca. 1 von 1000 Fällen) und ist mit einer Letalität von etwa 20 % verbunden [135]. Gewöhnlich verläuft die APME klinisch inapparent, kann allerdings bei bis zu 50% der Betroffenen zu Abnormalitäten im *Elektroenzephalogramm (EEG)* und einer Pleozytose im Liquor cerebrospinalis führen. Es wird bisher angenommen, dass sie das Resultat einer viral induzierten pathologischen Immunantwort des Gehirns mit autoimmunen Komponenten ist, die durch am Gefäßendothel des Hirns haftende infizierte Leukozyten oder infizierte Endothelzellen selbst gesteigert werden kann [136; 137; 138]. Zeitlich später auftretende Formen sind die *MIBE (measles inclusion body encephalitis)* und die *SSPE (subakute sklerosierende Panenzephalitis)*. Die *MIBE* tritt etwa 6 bis 10 Monate nach stattgehabter Masernvirusinfektion auf. Der Personenkreis der Betroffenen besteht ausschließlich aus Immunsupprimierten oder Personen mit bereits bestehendem Immundefekt. Sie ist daher eher als Resultat einer opportunistischen Infektion anzusehen und verläuft stets tödlich [139]. Etwa 6 bis 12 Jahre post infectionem mit einem Wildtyp-MV kann mit einer Frequenz von etwa 1:10 000 - 20 000 das Krankheitsbild der *SSPE* eintreten [140]. Im Gegensatz zur *MIBE* verfügen die Erkrankten über eine regelrechte antivirale Immunantwort. In der Vorgeschichte der meisten Patienten fand die Infektion mit Masernviren zu einem recht frühen Zeitpunkt statt (< 2 Jahre). Im Falle einer späteren Infektion reduziert sich das Risiko an *SSPE* zu erkranken [141]. Nicht gänzlich geklärt ist, ob eine genetische Prädisposition für die Erkrankung besteht, da Fälle von vermehrtem Auftreten innerhalb einer Familie bekannt sind [142; 143]. Regelmäßig ist ein progredienter Verlauf erkennbar. So stehen zu Beginn der *SSPE* in der Regel psychische Symptome, verbunden mit dem Abbau kognitiver Leistungen und behaviourale Abnormalitäten im Vordergrund. Die betroffenen Kinder fallen zunächst durch ein Nachlassen der schulischen Leistungen auf. Im Laufe der Zeit treten Symptome wie abnormales Verhalten, Reizbarkeit und Vergesslichkeit hinzu. Es treten dann neurologische Symptome in Form von

myoklonischen Zuckungen und Störungen des extrapyramidalmotorischen Systems wie Krampfanfälle und Hyperkinesien hinzu. Das Endstadium zeigt einen schweren mentalen Verfall, Opisthotonus mit dem Übergang in das apallische Syndrom [144; 44]. Bei der Diagnosefindung sind insbesondere die 5 *Diagnosekriterien nach Dyken* hilfreich:

1. Typisches klinisches Bild des progressiven subakuten mentalen Verfalls, verbunden mit stereotypen generalisierten Myoklonien.
2. Charakteristische EEG-Veränderungen (*Rademecker-Komplexe*, s. Abb. 1.8)
3. Erhöhte Globulin-Spiegel (>20% des Gesamtproteinspiegels) im Liquor cerebrospinalis
4. Erhöhte Antikörpertiter gegen MV im Liquor cerebrospinalis
5. Typischer histopathologischer Befund in Hirnbiopsien oder -autopsien



Abb. 1.9 | Rademecker-Komplexe während einer EEG-Aufzeichnung (entnommen aus [44])

Das EEG wurde am wachen Patienten abgeleitet. Die blauen Pfeile markieren die abgeleiteten Rademecker-Komplexe (hohe, generalisierte, stereotype periodischer Komplexe), die synchron während der gesamten Messung auftauchen. Sie treten häufig synchron zu Myoklonien auf. Einstellung während der Aufzeichnung: Papiervorschub: 30 mm/s, Sensitivität: 7 mm = 50 μ V, Hochpass-Filter: 70 Hz, Tiefpass-Filter = 1 Hz.

1.2.4 Diagnostik

Meist kann die Diagnose Masern bereits durch den charakteristischen klinischen Symptomenkomplex und ihrem epidemischen Auftreten im Zuge der klinischen Untersuchung gestellt werden. Nach Definition der *WHO* liegt die Erkrankung Masern vor, bei einem Auftreten der folgenden Symptome: Personen mit einem

generalisierten makulopapulösem Exanthem, verbunden mit Fieber ≥ 38 °C plus einem der folgenden Symptome: Husten, Schnupfen oder Konjunktivitis [145].

Typische hämatologische Laborbefunde sind eine Leukopenie, verbunden mit einer Granulopenie und Lymphopenie. Die Diagnoseempfehlungen des RKI bezüglich der serologischen Nachweismethoden einer Masernerkrankung haben sich in den letzten Jahren geändert. Zuvor war die Empfehlung, lediglich bei sporadischen Fällen, bei Erkrankung bereits geimpfter Personen und bei den ersten aufgetretenen Fällen im Rahmen eines Ausbruches einer Masernepidemie die Patienten serologisch zu untersuchen [146]. Heute wird empfohlen jede Verdachtsdiagnose serologisch zu bestätigen, da es häufig zu Fehldiagnosen, bzw. Verwechslungen mit anderen exanthemischen Erkrankungen durch die alleinige klinische Untersuchung gab [147]. Hierbei ist es auch wichtig isolierte Viren, bzw. ihre RNA genotypisch zu charakterisieren um eine Aussage über die Herkunft des Virus (einheimisch oder importiert) treffen zu können. Serologisch werden bei einer akuten Infektion masernspezifische Antikörper vom IgM-Typ aus dem Blut des Patienten bestimmt. Entscheidend ist hierbei der Zeitpunkt der Blutentnahme bezogen auf die Serokonversion. Die Patienten haben meist eine für die Untersuchung ausreichende Menge an IgM-Antikörpern ab dem dritten Tag nach Auftreten des Masernexanthems entwickelt, sodass eine Blutentnahme in diesem Zeitraum besonders zu empfehlen ist [148]. Bei einem Auftreten einer Masern-Reinfektion bei bereits Geimpften, die keine deutliche IgM-Antwort zeigen, ist ein negativer Befund nicht gleichbedeutend mit dem Ausschluss der Diagnose „Masern“. Hier sollte eine weitere Probenentnahme 10 bis 14 Tage später erfolgen und die Probe auf Titerverlauf des IgM-Antikörpers und die Entstehung von IgG-Antikörpern untersucht werden [147]. Zusätzlich zur Antikörperbestimmung sollte zusätzlich auch ein Virusnachweis per *RT-PCR* durchgeführt werden. Folgende Untersuchungsmaterialien können bereits nach dem Auftreten erster Symptome verwendet werden: Abstriche aus Nasopharynx oder Konjunktiven, Speichel, Bronchialsekret, Blut-Lymphozyten, Urin und Liquor. Sind die Proben positiv kann anschließend die Bestimmung des Genotyps in Bezug auf epidemiologische Fragestellungen erfolgen. Beim Probentransport ist auf eine

Aufrechterhaltung der Kühlkette zu achten. Eine Anzucht des Virus wird nur noch in Ausnahmefällen durchgeführt.

Die Krankheit unterliegt seit dem Inkrafttreten des Infektionsschutzgesetzes im Jahre 2001 der Meldepflicht, d.h. jede klinische Maserdiagnose und jeder diese bestätigender Laborbefund ist an das *RKI* zu melden (§6 und 7 *IfSG*) [146].

1.2.5 Therapie und Prophylaxe

1.2.5.1 Therapie

Derzeit ist keine spezifische antivirale Therapie für die Behandlung der akuten Masern oder ihrer neurologischen Komplikationen verfügbar. Das derzeitige Therapieregime beschränkt sich auf rein symptomatische Maßnahmen, wie die Gabe von Antipyretika und Antitussiva bei gleichzeitig angeordneter Bettruhe. Im Falle von zusätzlich auftretenden bzw. bestehenden bakteriellen Superinfektionen der Atemwege oder des Auftretens einer *Otitis media* werden zusätzlich Antibiotika verordnet. Ebenso kann eine prophylaktische Gabe eines Antibiotikums erwogen werden [149; 102]. Darüber hinaus wird seitens *WHO* und *UNICEF* bei Patienten aus Ländern, die mit hoher Wahrscheinlichkeit einen Vitamin A-Mangel aufweisen, dessen Supplementation empfohlen [150], wodurch eine erheblich Reduktion der Mortalitätsrate erzielt werden [151; 152]. In der Behandlung der *SSPE* wurde der therapeutische Nutzen einer Gabe von *INF α* mit Ribavirin zwar eingehender untersucht, und obwohl hierbei positive Effekte erzielt werden konnten [153; 154; 155], zeigten Langzeitergebnisse doch meist Rückfälle [156] oder waren zu ineffektiv um den Krankheitsverlauf entscheidend zu beeinflussen [157]: Die *SSPE* verläuft daher nach wie vor tödlich.

1.2.5.2 Prophylaxe

Bisher einziger und bester Schutz sich vor einer Infektion mit dem MV zu schützen stellt die Schutzimpfung in Form eines attenuierten Lebendimpfstoffes dar. Meist erfolgt diese Impfung als Gabe eines Kombinationsimpfstoffes (*MMR*), die mit Röteln- und Mumpsvirus zwei weitere attenuierten Viren enthält. Es steht zudem der sogenannte *MMRV*-Impfstoff zur Verfügung, welcher zusätzlich den Schutz vor

dem Varizella-Zoster-Virus (*VZV*, *Humanes Herpesvirus 3*, *HHV 3*) miteinschließt. Jedoch zeigten Untersuchungen, dass es bei dessen Verimpfung im Vergleich zum herkömmlichen *MMR*-Impfstoff vermehrt Fieberkrämpfe in Erscheinung treten [158]. Die ständige Impfkommision (*STIKO*) des *RKI* schlägt die Masern betreffend aktuell folgendes Impfschema vor [159]: Die Impfung sollte im Alter zwischen 11 und 14 Monaten erfolgen. Eine Zweitimpfung wird bereits seit 2001 allgemein empfohlen und sollte kurz vor Erreichen des 2. Lebensjahres durchgeführt werden [160]. Steht bei Kindern unter einem Jahr die Aufnahme in Kindereinrichtungen bevor, kann die erste Impfung vorverlegt werden, jedoch sollte sie nicht vor Erreichen des 9. Lebensmonates stattfinden. Im Falle der vorzeitigen Gabe, verschiebt sich die Auffrischungsimpfung ebenfalls nach vorne. Sie sollte dann zu Beginn des 2. Lebensjahres erfolgen.

Immer wieder werden verschiedene Vakzine, insbesondere im Falle der *MMR*-Schutzimpfung nach der Studie von *Wakefield et al.* im Jahre 1999 [161] (inzwischen von *Lancet* zurückgezogen), mit der ätiologischen Genese des Autismus in Verbindung gebracht. Obwohl bereits damals heftig kritisiert, stieß es auf großes Gehör in den Medien. Derzeitiger Stand der Forschung anhand weiterer epidemiologischen Untersuchungen ist, dass weder die Verabreichung des Kombinationsimpfstoffes *MMR*, noch die Verabreichung eines alleinigen Masernvakzins ätiologisch für die Entstehung des Autismus verantwortlich sind [162; 163].

1.3 RNA-Interferenz (*RNAi*)

RNAi ist ein in Zellen eukaryotischer Lebewesen natürlich vorkommender Mechanismus, der eine zielgerichtete Ausschaltung von Genen auf posttranskriptionaler Ebene darstellt. Zum ersten Mal beobachtet wurde dieses Phänomen bereits 1990, als die Botaniker *Joseph Mol* und *Richard Jorgensen* versuchten die Blütenfarbe von Petunien zu verstärken indem sie Kopien des Gens der *Dihydroflavonol-Reduktase* in Pflanzen einbrachten. Das Ergebnis war jedoch nicht die erhoffte Steigerung einer Synthese der Blütenfarbstoffe, sondern genau das Gegenteil war der Fall. Die Phänotypen der genetisch behandelten Pflanzen hatten überraschenderweise weniger Blütenfarbstoff synthetisiert und somit

weniger stark gefärbt als die unbehandelten Pflanzen. Einzelne waren sogar schneeweiß. Die Forscher bezeichneten dieses Phänomen zunächst als „Cosuppression“ [164]. Acht Jahre später konnte dann der eigentliche Effekt dieses Phänomen durch die beiden Amerikaner *Craig Mello* und *Andrew Fire* durch ihre Arbeiten an dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* aufgeklärt werden [165]. Durch die Injektion doppelsträngiger RNA-Moleküle konnte in den untersuchten Tieren ein vollständiger und spezifischer Gen-knockdown nachgewiesen werden. Nachfolgend erkannte man das ungeheure Potential, welches verbunden mit der bis dato kürzlich bekannten Sequenzen der Genome von verschiedenen Arten von Lebewesen, in dieser Technik steckte. Das Wissenschaftsjournal *Science* kührte wenig später die *RNAi* zum „*Breakthrough of the Year 2002*“ [166] und nur wenig später, im Jahre 2006 folgte die Verleihung des Nobelpreises in der Kategorie Medizin und Physiologie an die beiden Forscher *Andrew Fire* und *Craig Mello* für deren Entdeckung.

Neben der Funktion des einfachen „Ausschaltens“ spezifischer Gene, bietet sie einen neue Möglichkeit der Therapie bestimmter Krankheiten indem die genetische Aktivität gezielter Gene unterbunden werden kann. Die Anwendbarkeit erstreckt sich dabei auf sämtliche Pathomechanismen wie etwa Krebsgene, Autoimmunprozesse oder Infektionskrankheiten.

1.3.1 Mechanismus der *RNAi*

Der Mechanismus der *RNAi* kann in verschiedenen Arten eukaryotischer Lebewesen (Pflanzen, Pilze, Tiere) beobachtet werden. In Vertretern dieser konnten insgesamt drei konservierte Komponenten indentifiziert werden: *Dicer*, *Argonaute-Piwi*, and *RNA-abhängige RNA-Polymerase (RaRP)*. Es wird daher angenommen, dass die *RNAi* entwicklungsgeschichtlich ein schon sehr alter Vorgang zu sein scheint [167].

Genauer versteht man darunter eine durch doppelsträngige RNA (*dsRNA*) hervorgerufenen sequenzspezifisches, posttranskriptionelles „*gene-silencing*“. Bisher wurden zwei Haupttypen doppelsträngiger RNAs identifiziert, die für den hervorgerufenen gene-knockdown verantwortlich sind. Dies sind *short interfering RNAs (siRNAs)* und *microRNAs (miRNAs)* [168]. *MiRNAs* sind kurze (ca. 20 bis 23

nts), hoch konservierte, nicht kodierende RNAs die Funktionen in dem komplexen Netzwerk der Genregulation innerhalb der Zellen eines Organismus wahrnehmen [169]. Bei Säugetieren befinden sich ihre Gene auf den Chromosomen im Zellkern als Teil des Genoms. Nach ihrer Transkription durch die *RNA-Polymerasen II* [170] haben die Primärtranskripte (*primary microRNA, pri-microRNA*) eine Länge von etwa 500 – 3000 nts, besitzen einen *Poly-A-Schwanz* am 3'- und ein *7-Methylguanosin-Cap* am 5'-Ende. Aufgrund elektrochemischen Eigenschaften lagern sie sich innerhalb des Nukleus in einer Schleifenform an. Nachfolgend erfolgt hier die Spaltung der *pri-micro-RNA* durch das Enzym *Drosha (RNase III)*. Es ist ein relativ großes Protein mit einer Größe von etwa 160 kDa, das in Tieren, jedoch nicht in Pflanzen konserviert ist [171; 172; 173]. In humanen Zellen benötigt *Drosha* zusätzlich den Kofaktor *DGCR 8 (DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8-Protein)*, auch bekannt als *Pasha* in *Drosophila melanogaster* und *C. elegans* [174; 175]. Zusammen bilden sie den sogenannten Mikroprozessor-Komplex, der die *pri-miRNA* auf eine Länge von ca. 70 nt kürzt. Sie wird fortan als *precursor micro-RNA (pre-miRNA)* bezeichnet [176; 177]. Auch sie hat eine für sie typische Haarnadelform. Die *pre-miRNA* kann über das Membranprotein *Exportin-5* aus dem Zellkern in das Zytoplasma befördert werden. *Exportin-5* gehört zur Familie der Karyopherine. Der Transport von *pre-miRNAs* ist sättigbar und demzufolge Carrier-vermittelt. Zugleich benötigt dieser aktive Transport vom Inneren des Zellkerns in das Zytoplasma die Bindung des kleinen G-Proteins *Ran-GTP* als Kofaktor an das Protein [178]. Im Zytoplasma werden die *pre-miRNAs* durch das Enzym *Dicer*, einem *RNase-III-Enzym*, auf ihre endgültige Länge von ca. 22 nt (*ds-miRNAs* bzw. *miRNA-Duplexes*) geschnitten [179]. *Dicer* interagiert zusätzlich mit *TRBP (human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein)* [180]. *siRNAs* sind *dsRNAs* mit einer Länge von etwa 20 bp mit jeweils zwei überstehenden Nukleotiden an ihren Enden. Sie werden entweder aus *dsRNAs* im Inneren der Zelle gebildet, oder direkt als *siRNAs* in die Zelle verbracht. Die *dsRNAs* können sowohl endogenen, als auch exogenen Ursprungs sein. Für die Spaltung der *dsRNA* wird analog zur *pre-miRNA* das Enzym *Dicer* benötigt.

Gemeinsame Endstrecke von *miRNAs* und *siRNAs* im Verlauf der *RNAi* ist die Destruktion der Ziel-mRNA durch einen Multiproteinkomplex genannt *RISC*.

Zentraler Bestandteil dessen ist ein Mitglied der Argonaute-Familie. Einzelne Mitglieder dieser Familie haben eine Nukleaseaktivität, die für die Spaltung der mRNA verantwortlich ist (*Slicer-Aktivität*). Nach dieser Spaltung kann die Translation und dementsprechend die Expression des Zielproteins nicht mehr stattfinden. Alternativ besteht noch die Möglichkeit einer Suppression der Translation ohne die vorherige Zerstörung des mRNA-Stranges. Diese Methode ist jedoch eher typisch für das *miRNA*-vermittelte gene-silencing auf die im weiteren Text näher eingegangen wird [181]. Eine Übersicht über den Mechanismus der *RNAi* ist der Abb. 1.10 zu entnehmen.

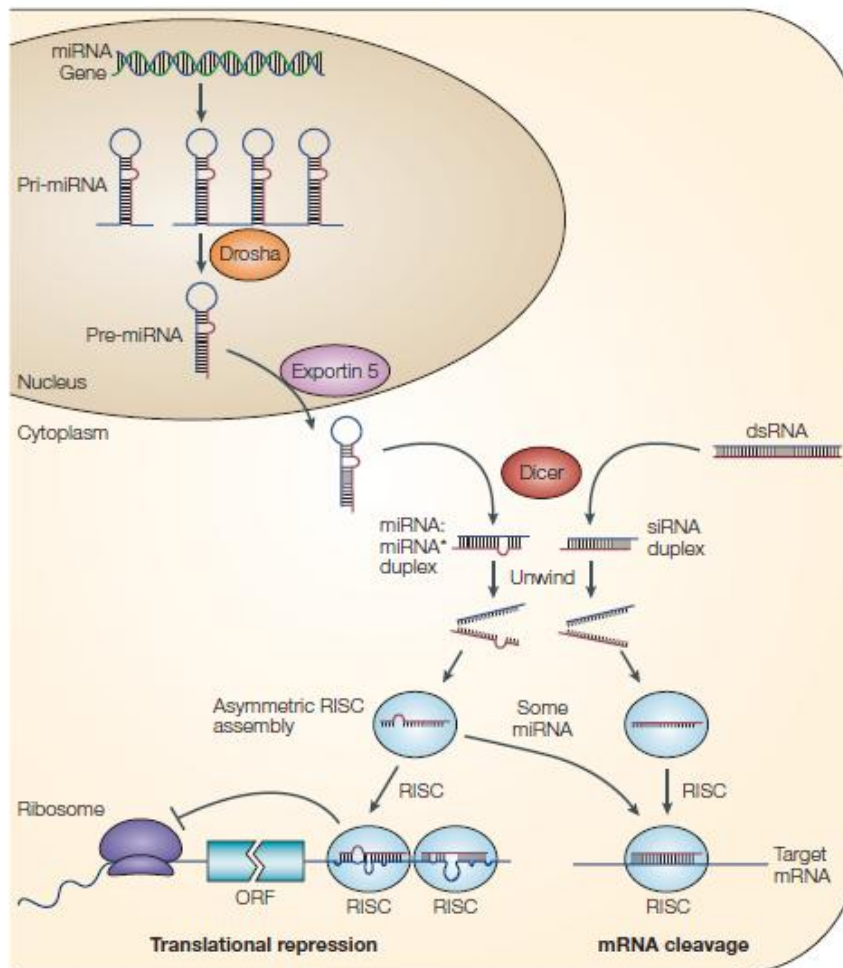


Abb. 1.10 | Schematische Darstellung des *siRNA* und *miRNA* induzierten „Gene-silencing“ (entnommen aus [169])

MiRNAs lagern sich zu Effektor-Komplexen zusammen, auch bekannt als *miRNP*, *Mirgonaute* oder *miRISC* (*miRNA-containing RNA-induced silencing complex*). Analog dazu, werden Komplexe, die anstatt *miRNA* *siRNA* enthalten als *RISC*, *Sirgonaute* oder *siRISC* bezeichnet [182]. Zum besseren Verständnis werden *miRISC*, sowie *siRISC* im Folgenden als *RISC* bezeichnet. Vor der Zusammensetzung des *RISC* erfolgt die Trennung beider RNA-Stränge der ds-*miRNA* mittels einer Helikase. Es folgt die Bindung bzw. Aufnahme lediglich eines *miRNA*- bzw. *siRNA*-Stranges in den *RISC*. Der andere Strang wird intrazellulär abgebaut. Proteine des menschlichen Körpers, die fähig sind *siRNAs* oder *miRNAs* intrazellulär zu binden sind die Mitglieder der Argonaute-Familie *Ago1-4* [181]. Von ihnen ist jedoch nur *Ago2* in einem spaltungskompetenten *RISC* anzutreffen und somit auch für die Spaltung der Ziel mRNA (*Slicer-Aktivität*) durch *miRNAs* und *siRNAs* verantwortlich [183; 184]. Innerhalb der Argonaute-Proteinfamilie gibt es zwei konservierte Bereiche: Die *PIWI*- (*P-element-induced wimpy testis*) und die *PAZ* (*PIWI-Argonaut-Zwille*)-Domäne. Durch weitere Untersuchungen an *Ago2* mittels Kristall-Struktur-Analysen an *Pyrococcus furiosus* und *Archaeoglobus fulgidus* *Piwi* (*AfPiwi*) konnte bestätigt werden, dass die *PIWI*-Domäne eine Endonukleaseaktivität (*RNAseH*) besitzt [185; 186] und daher für die Spaltung von mRNAs verantwortlich ist [187]. Die gesplattene mRNA wird anschließend durch intrazelluläre RNAsen abgebaut. Genauere Informationen über die einzelnen Bereiche von *Ago2* und deren Funktion ihrer *Slicer-Aktivität* betreffend ist Abb. 1.11 zu entnehmen.

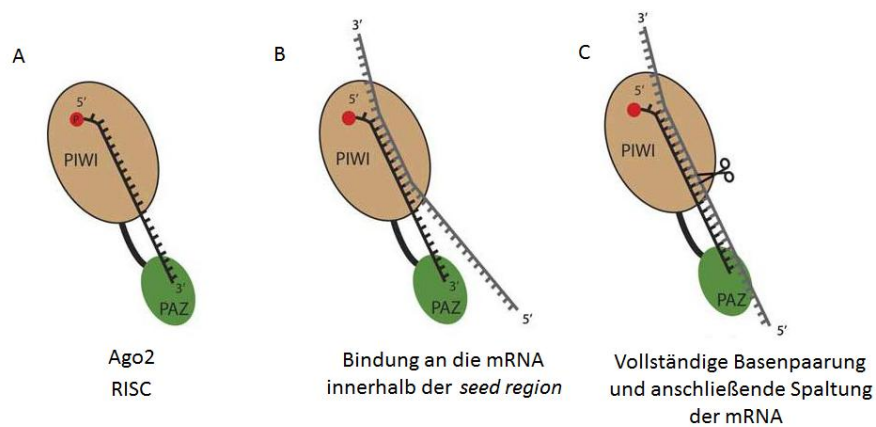


Abb. 1.11 | Schema der Slicer-Katalyse (abgeändert nach [181])

A Das 5'-Ende der siRNA bzw. miRNA ist an die PIWI-Domäne und das 3'-Ende an die PAZ-Domäne gebunden.

B Die mRNA wird innerhalb der seed region (Nukleotide 2-8 der siRNA/miRNA) gebunden. Diese Basenpaarung wird in die 3'-Richtung der siRNA fortgesetzt.

C Die RNaseH schneidet daraufhin die mRNA via Hydrolyse. Anschließend wird die mRNA freigegeben und das Enzym wird wiederaufbereitet und steht anschließend für neue Reaktionen zur Verfügung.

Die Rolle der miRNAs und ihre Funktion der Genregulation erfolgt zudem über die Bindung des miRISC an die 3' untranslatierte Region (3'-UTR) von mRNAs bestimmter Zielgene. Dies führt in Abhängigkeit der Komplementarität von synthetisierten miRNA zu mRNA entweder zur Inhibition der Translation oder dem intrazellulären Abbau der mRNA: Es wird postuliert, dass eine partielle Komplementarität zu einer Hemmung der Translation führt, während eine exakte Komplementarität der Basen von mRNA und miRNA in einer Degradation der Ziel-mRNA endet [188]. Es gibt mehrere Möglichkeiten wie eine Inhibition der Translation bewerkstelligt werden könnte. Zum Einen könnten die mit miRNAs besetzten mRNAs an Polysomen sequestriert werden [189] oder eine Depletion in *processing bodies* (P-bodies) erfolgen, in denen sie anschließend degradiert werden [190; 191]. Ein Schema dieses Vorgangs ist der Abb. 1.12 zu entnehmen.

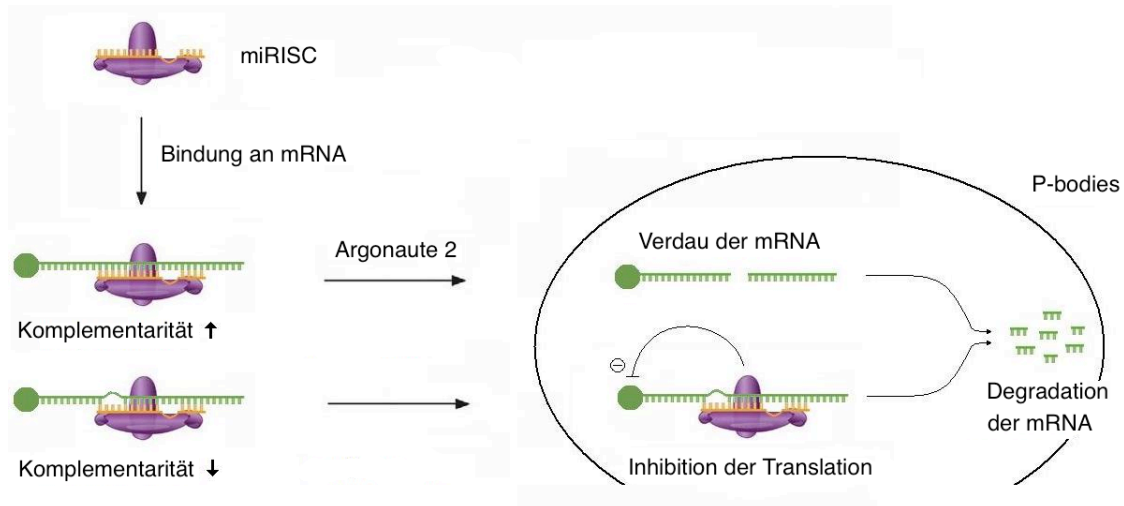


Abb. 1.12 | Schema der Wege einer Genexpression bezüglich *miRNA*

1.3.2 Klinische Anwendung der RNAi

Neben der Möglichkeit die Funktion einzelner Gene in Organismen näher zu untersuchen und ihrer heutzutage immensen Bedeutung als Methode in zellbiologischen Fragestellungen, könnte die *RNAi* ein äußerst wertvolles Instrument zur Therapie von Krankheiten darstellen. Das Spektrum einer möglichen Anwendbarkeit ist groß und reicht von der Bekämpfung von Infektionserregern oder Erkrankungen des autoimmunen Formenkreises bis hin zur Entwicklung neuer Therapieansätze für die Behandlung diverser Krebsleiden. Vor einer wirklich praktikablen Anwendung dieser Technik, gilt es jedoch noch zahlreiche Probleme zu lösen. Bisher größtes zu überwindendes Problem stellt die praktikable *in vivo* Applikation und ihre gewebsspezifische Wirkung dar. Durch den Tropismus einzelner Keime auf bestimmte Organe bzw. Organsysteme, sowie die Pathogenese von Krebsleiden, Autoimmunerkrankungen, etc. innerhalb bestimmter Gewebe wäre eine gewebsspezifisch Anwendbarkeit von großem Vorteil. Darüber hinaus sollten *siRNAs* an ihrem Zielort, dem Intrazellulärraum, in möglichst hohen Konzentrationen vorliegen um eine dementsprechend hohe Translationshemmung zu erzielen. Dies könnte sich im Zuge einer Therapie bestimmter Krebsleiden als schwierig erweisen, da durch die hohe Rate an

Zellteilungen der Tumorzellen die Anzahl der eingebrachten *siRNA*-Moleküle proportional abnimmt.

Werden „nackte“ *siRNAs* in den Körperkreislauf appliziert, findet ein rascher Abbau durch körpereigene RNAsen mit darauffolgender renaler Clearance statt [192]. Eine Möglichkeit dieses Problem zu umgehen, stellt die chemische Modifikation der *siRNAs* dar. Diese können an verschiedenen Stellen innerhalb des Moleküls eingebracht werden, wie etwa der Base, dem Zuckermolekül oder dem RNA-Rückgrat. Durch diese Modifikationen kann nicht nur die Widerstandsfähigkeit gegenüber den Nukleasen verringert werden, sondern oft auch die Rate des Knockdowns erhöht und die Spezifität gegenüber dem Zielprotein erhöht werden [193]. Zusätzlich besteht die Möglichkeit einer Konjugierung von *siRNAs* an diverse Moleküle bzw. Liganden, um einen zielgerichteten Transport in bestimmte Gewebe zu ermöglichen und gleichzeitig ihren Verdau zu verhindern. So konnten beispielsweise *anti-ApoB-siRNAs*, die mit Cholesterol konjugiert wurden, in Lebergewebe von Nagetieren verabreicht werden und dort ihre Wirkung in der Therapie der Hypercholesterinämie entfalten [194; 195]. Ebenso ist die topische Applikation eines Wirkstoffes mit nachfolgender Penetration der Gewebeschichten durch dessen Bindung an Cholesterol denkbar. Diesbezüglich konnten in Tierversuchen Infektionen mit dem *Herpes simplex Virus Typ 2* reduziert werden [196]. Ebenso konnten in Zellen, die das Transmembranprotein *Sid-1* exprimieren, welches verantwortlich für die intrazelluläre Aufnahme von dsRNA in *C. elegans* ist [197], vermehrt *siRNAs* aufgenommen werden und zu einem Genknockdown führen [198; 199]. Der Großteil zu entwickelnder Arzneistoffe befindet sich derzeit noch in der Tiermodellphase. Jedoch gibt es zum jetzigen Zeitpunkt auch erste präklinische Studien, die sich in Phase I und II der Medikamentenzulassung befinden. Eine breite Anwendung am Patienten hat jedoch noch nicht stattgefunden [200; 201]. Ebenso wäre eine Anwendung von Nanopartikeln etwa in Form von Liposomen denkbar. Ein weiteres Problem, welches in der medikamentösen Therapie umgangen bzw. ausgeschlossen werden muss, sind die sog. „*Off-target-effects*“. Sie sind das Resultat einer Mitbeeinflussung der Genexpression von nicht Zielproteinen [202]. Man geht davon aus, dass Proteine, welche eine ähnliche

Nukleotidstruktur haben, wie das Zielprotein der *RNAi*, abgebaut oder in ihrer Translation gehemmt werden. Diese Effekte können auch zelltoxisch sein und müssen daher, um Medikamentennebenwirkungen zu umgehen, unbedingt ausgeschlossen werden.

Wie man sieht, muss noch eine Vielzahl von Problemen gelöst werden, bevor eine breite klinische Anwendung von auf *RNAi*-basierenden Medikamenten für ein großes Patientenkollektiv verfügbar ist. Doch zeigen bisherige Lösungsansätze schon vielversprechende Ergebnisse. Eine Neuentwicklung bzw. Weiterentwicklung der bisher verfügbaren Methoden sollte daher unbedingt weiterverfolgt werden, da die Anwendung von Pharmaka, die auf der *RNAi* basieren, die Zukunft der medizinischen Therapiemöglichkeiten in großem Maße bereichern könnte.

1.4 Ziel der Arbeit

SSPE ist eine demyelinisierende Krankheit des ZNS, die durch eine persistierende Infektion von Neuronen und Gliazellen durch Masernviren hervorgerufen wird. Eine gezielte Therapie dieser Erkrankung ist zum derzeitigen Stand der Forschung nicht möglich und bisherige Therapieversuche bei Betroffenen haben lediglich symptomatischen Charakter. Obwohl sowohl die angeborene, als auch die adaptive Immunantwort des Wirtes intakt sind, schreitet die Erkrankung unaufhaltsam bis zum Tod der Betroffenen fort. Eine Methode und möglicher Therapieansatz gegen virale Infektionen und deren Replikation vorzugehen, stellt die *RNA-Interferenz* dar. Durch das gezielte Ausschalten der Expression bestimmter viraler Gene kann als Folge auch die Virusreplikation in beträchtlichem Maße inhibiert werden.

Um die Effizienz einer Auswahl von *siRNAs* in Bezug auf ihr Vermögen eines Gen-Knockdowns bestimmter Proteine des MV quantitativ zu erfassen, sollte zunächst ein plasmidbasierendes Testsystem etabliert werden. Zellen, in welche das Testsystem transfiziert wurde, sollten anschließend mittels Durchflusszytometrie quantitativ auf ihr Vermögen eines Gene-Knockdown untersucht werden. Aus diesem Pool der getesteten *siRNAs* sollten die effektivsten Sequenzen in puncto gene-silencing anschließend auf ihre Wirkung in mit MV infizierten Zellkulturen untersucht werden. Anhand Vorarbeiten auf diesem Gebiet

ist bereits bekannt, dass die virale Replikation bei der akuten Masernvirusinfektion äußerst wirkungsvoll inhibiert werden kann [42]. In einem weiteren Schritt soll nun untersucht werden, ob persistierende Infektionen, die eigentliche Grundlage der *SSPE*, zunächst in Zellkulturen und anschließend im Tiermodell, mittels *RNAi* wirkungsvoll inhibiert werden, bzw. eliminiert werden können.

2 Material

2.1 Zellen

Zelllinie	Beschreibung	Herkunft
293T-Zellen	Nierenfibroblast, transfiziert mit T-Antigen von <i>SV40</i>	Mensch (<i>Homo sapiens sapiens</i>)
Vero-Zellen	Epithelzellen der Niere	Afrikanische Grüne Meerkatze (<i>Chlorocebus aethiops</i>)
HeLa-Zellen	Epithelzellen des Zervixkarzinoms	Mensch (<i>Homo sapiens sapiens</i>)
NT2-Zellen	Zellen des Teratokarzinoms	Mensch (<i>Homo sapiens sapiens</i>)
piNT2HCRed-Zellen	Persistierende Infektion von NT2-Zellen mit <i>MV^{Edtag}CAMHeHCRed</i>	Mensch (<i>Homo sapiens sapiens</i>)

Tab. 2.1 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen

Alle verwendeten Zellen waren im Bestand der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies am Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg. Die persistierende Infektion der *piNT2HCRed-Zellen* wurde eigens für die vorliegende Arbeit im Labor generiert, indem NT2-Zellen gemäß dem Protokoll aus Kap. 3.4.9 mit *MV^{Edtag}CAMHeHCRed* infiziert wurden.

2.2 Bakterien

Bakterien wurden zur Transformation und Amplifikation von Plasmiden verwendet. In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich gram-positive *XL10-Gold Escheria coli*-Bakterien (*E. coli*) von *Invitrogen* (Karlsruhe) verwendet. Aliquotiert in Kryokonservierungsröhrchen wurden sie bei -80°C gelagert.

2.3 Viren

Virus-Stamm	Virus-Typ
MV-Edmonston	Laborstamm Edmonston B Vaccine/60s
MV ^{Edtag} CAMHeHCRed	Rekombinantes MV-Edmonston
MV ^{Edtag} CAMHeGFP	Rekombinantes MV-Edmonston

Tab. 2.2 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Viren

Die Masernviren des Stammes *MV-Edmonston* und *MV^{Edtag}CAMHeGFP* waren im Bestand der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies am Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg. *MV^{Edtag}CAMHeHCRed* wurde uns von Linda Rennick (*Department of Molecular Virology, Centre for Infection and Immunity, School of Medicine, Dentistry and Biomedical Sciences der Queen's University of Belfast, United Kingdom*) für die vorliegende Arbeit zur Verfügung gestellt.

2.4 Plasmide

Plasmid	Nähere Beschreibung
pEMC-La	Kodiert für das Large-Protein des MV
pSC-M	Kodiert für das Matrix-Protein des MV
pSC-N	Kodiert für das Nukleokapsid-Protein des MV
pSC-P	Kodiert für das Phosphoprotein des MV
pDsRed2-C1	Exprimiert das Fluoreszenzprotein <i>DsRed2</i> , direkt im Anschluss in 5'-Richtung befindet sich eine <i>Multiple Cloning Site</i>
pDsRed2-C1-stop	Das Fluoreszenzprotein <i>DsRed2</i> und die <i>multiple cloning site</i> sind durch ein via Mutagenese eingefügtes STOP-Codon voneinander getrennt
pF6gW	Sofern in den Vektor kloniert, wird über einen U6-Promoter ein shRNA-Oligonukleotid exprimiert. Über einen Ubiquitin-Promoter-Enhancer wird als Transfektionskontrolle zusätzlich das Fluoreszenzprotein eGFP exprimiert.
pDsRed2-C1-stop-L	pDsRed2-C1-stop in welches das Large-Protein aus pEMC-La kloniert wurde
pDsRed2-C1-stop-M	pDsRed2-C1-stop in welches das Matrix-Protein aus pSC-M kloniert wurde

pDsRed2-C1-stop-N	pDsRed2-C1-stop in welches das Nukleokapsidprotein aus pSC-N kloniert wurde
pDsRed2-C1-stop-P	pDsRed2-C1-stop in welches das Phosphoprotein aus pSC-P kloniert wurde
pF6gW-L4	pF6gW in welches das Oligonukleotid L4* kloniert wurde
pF6gW-L6	pF6gW in welches das Oligonukleotid L6* kloniert wurde
pF6gW-L7	pF6gW in welches das Oligonukleotid L7* kloniert wurde
pF6gW-M1	pF6gW in welches das Oligonukleotid M1* kloniert wurde
pF6gW-M3	pF6gW in welches das Oligonukleotid M3* kloniert wurde
pF6gW-M4	pF6gW in welches das Oligonukleotid M4* kloniert wurde
pF6gW-N1	pF6gW in welches das Oligonukleotid N1* kloniert wurde
pF6gW-N2	pF6gW in welches das Oligonukleotid N2* kloniert wurde
pF6gW-N3	pF6gW in welches das Oligonukleotid N3* kloniert wurde
pF6gW-P1	pF6gW in welches das Oligonukleotid P1* kloniert wurde
pF6gW-P2	pF6gW in welches das Oligonukleotid P2* kloniert wurde
pF6gW-P6	pF6gW in welches das Oligonukleotid P6* kloniert wurde
pLL3.7-Thy 1.1	pLL3.7 in welches die genetische Information von eGFP, gegen den Oberflächenmarker Thy1.1 ausgetauscht wurde
pF6gW-M4-Thy1.1	pF6gW-M4, in welches eGFP gegen Thy1.1 ersetzt wurde
pF6gW-P6-Thy1.1	pF6gW-P6, in welches eGFP gegen Thy1.1 ersetzt wurde

Tab. 2.3 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen
(Für die Sequenz der mit * markierten Oligonukleotide siehe Kap. 2.4.1.)

2.5 DNA-Oligonukleotide und Peptide

2.5.1 DNA-Oligonukleotide zur Herstellung der *shRNAs*

Im Folgenden ist eine Auflistung aller DNA-Oligonukleotide zu sehen, welche nach dem Annealing des forward- und reverse-Stranges in den lentiviralen Vektor *pF6gW* kloniert wurden (für genauere Informationen zur Präparation s. Kap. 3.3.9 und 3.3.7).

Bezeichnung	Richtung	Sequenz
shRNA-Kontrolle	Forward	5'-TCT CAA CGG TCA ACA TAT TAC TGT GAA GCC ACA GAT GGG TAA TAT GTT GAC CGT TGA GTT TTT TC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAC TCA ACG GTC AAC ATA TTA CCC ATC TGT GGC TTC ACA GTA ATA TGT TGA CCG TTG AGA-3'
shRNA-L4	Forward	5'-TGA GCA TCG CAA GAT GTG TAC TGT GAA GCC ACA GAT GGG TAC ACA TCT TGC GAT GCT CTT TTT TC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAG AGC ATC GCA AGA TGT GTA CCC ATC TGT GGC TTC ACA GTA CAC ATC TTG CGA TGC TCA-3'
shRNA-L6	Forward	5'-TCC AGG GAC CTG CCC ACC AAC TGT GAA GCO ACA GAT GGG TTG GTG GGC AGG TCC CTG GTT TTT TC-3'
	Reverse	5'-GCG AGA AAA AAC CAG GGA CCT GCC CAC CAA CCC ATC TGT GGC TTC ACA GTT GGT GGG CAG GTC CCT GGA-3'
shRNA-L7	Forward	5'-TTC GGG TTG AAC TCA TCT GCC TGT GAA GCC ACA GAT GGG GCA GAT GAG TTC AAC CCG ATT TTT TC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAT CGG GTT GAA CTC ATC TGC CCC ATC TGT GGC TTC ACA GGC AGA TGA GTT CAA CCC GAA-3'
shRNA-M1	Forward	5'-TTC GAA AAG ATG GGC CTG ATC TGT GAA GCC ACA GAT GGG ACC AGG CCC ATC TTT TCG ATT TTT TC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAT CGA AAA GAT GGG CCT GGT CCC ATC TGT GGC TTC ACA GAC CAG GCC CAT CTT TTC GAA-3'
shRNA-M3	Forward	5'-TCT CGG GTT CAA GAA GAC CCT GTG AAG CCA CAG ATG GGG GTC TTC TTG AAC CCG AGT TTT TTC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAC TCG GGT TCA AGA AGA CCC CCA TCT GTG GCT TCA CAG GGT CTT CTT GAA CCC GAG A-3'
shRNA-M4	Forward	5'-TCC TGC TGG TGA CCC TTA GGA CTG TGA AGC CAC AGA TGG GTC CTA AGG GTC ACC AGC AGG TTT TTT C-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAC CTG CTG GTG ACC CTT AGG ACC CAT CTG TGG CTT CAC AGT CCT AAG GGT CAC CAG CAG GA-3'
shRNA-N1	Forward	5'-TAG AAG GGT AGT TGG TAA ATC TGT GAA GCC ACA GAT GGG ATT CAC CAA CTA CCC TTC TTT TTT TC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAG AAG GGT AGT TGG TGA ATC CCA TCT GTG GCT TCA CAG ATT CAC CAA CTA CCC TTC TA-3'
shRNA-N2	Forward	5'-TCT CCA TGG GAG GTT TGA ACC TGT GAA GCC ACA GAT GGG GTT CAA ACC TCC CAT GGA GTT TTT TC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAC TCC ATG GGA GGT TTG AAC CCC ATC TGT

		GGC TTC ACA GGT TCA AAC CTC CCA TGG AGA-3'
shRNA-N3	Forward	5'-TTC CCT GGA GAT TCC TCA ACT GTG AAG CCA CAG ATG GGT TGA GGA ATC TCC AGG GAT TTT TTC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAT CCC TGG AGA TTC CTC AAC CCA TCT GTG GCT TCA CAG TTG AGG AAT CTC CAG GGA A-3'
shRNA-P1	Forward	5'-TGC ACT GGG TTA CAG TGT TAC TGT GAA GCC ACA GAT GGG TAA CAC TGT AAC CCA GTG CTT TTT TC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAG CAC TGG GTT ACA GTG TTA CCC ATC TGT GGC TTC ACA GTA ACA CTG TAA CCC AGT GCA-3'
shRNA-P2	Forward	5'-TGA TGC TGA CTC TAT CAT GGC TGT GAA GCC ACA GAT GGG CCA TGA TAG AGT CAG CAT CTT TTT TC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAG ATG CTG ACT CTA TCA TGG CCC ATC TGT GGC TTC ACA GCC ATG ATA GAG TCA GCA TCA-3'
shRNA-P6	Forward	5'-TGC TAG AAT CAC TGC TGT TAC TGT GAA GCC ACA GAT GGG TAA CAG CAG TGA TTC TAG CTT TTT TC-3'
	Reverse	5'-TCG AGA AAA AAG CTA GAA TCA CTG CTG TTA CCC ATC TGG GGC TTC ACA GTA ACA GCA GTG ATT CTA GCA-3'

Tab. 2.4 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur Herstellung von shRNAs

2.5.2 Primer

Primer für die Sequenzierung und Kontrolle durchgeführter Klonierungen der shRNA-Oligonukleotide in die shRNA-Expressionskassette von *pF6gW*:

Forward-Primer:

F6gW-seq forward: 5'- GTT AAT TAA ATC CGA CGC CGC C -3'

F6gW-seq forward 2: 5'- CTA TAG AGG CTT AAT GTG CG -3'

Reverse-Primer:

F6gW-seq reverse: 5'- ACT TTT CCT CGC CTG TTC CGC -3'

Primer für die Sequenzierung bzw. PCR zur Kontrolle durchgeführter Klonierungen der Maserngene L, M, N und P in die Expressionskassette von *pDsRed2-C1-stop*:

Forward-Primer:

pDsRed2-seq forward: 5'- AAG CTG AAG GAC GGC GGC CAC -3'

pDsRed2-stop-L-PCR forward: 5'- ATT CGA CAA CAT CCA GGC -3'

Reverse-Primer:

pDsRed2-seq reverse: 5'- ATT TTA TGT TTC AGG TTC AGG GGG AGG -3'

Primer für die Mutagenese von *pDsRed2-C1* in *pDsRed2-C1-stop*:

Forward-Primer:

DsRed2-stop forward: 5'-CACCACCTGTTCTGTAATCTCGAGCTCAAGC-3'

Reverse-Primer:

DsRed2-stop reverse: 5'-GCTTGAGCTCGAGATTACAGGAACAGGTGGTG-3'

Primer für die Sequenzierung und PCR zur Kontrolle durchgeführter Klonierungen des Gens DsRed2 in *pF6gW*:

Forward-Primer:

DsRedin forward: 5'- TTT TGA ACT ATG CGC TCG GGG -3'

Reverse Primer:

DsRedin reverse: 5'- TCA TAA AGA GAC AGC AAC C -3'

2.5.3 DNA-Standard für Agarose-Gele

Zur Größenbestimmung von DNA-Fragmenten in einer Agarose-Gel-Elektrophorese wurde in der vorliegenden Arbeit ausschließlich der DNA-Standard „GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder“ von *Fermentas* (St. Leon-Rot) verwendet (s. Abb. 2.1).

GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder

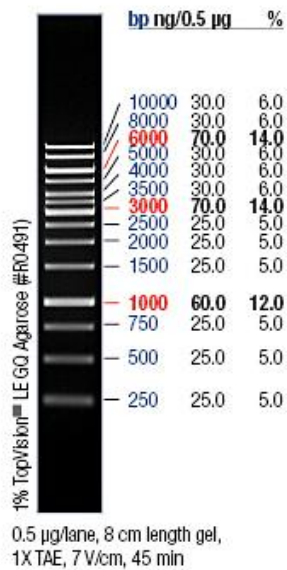


Abb. 2.1 | DNA-Standard GeneRuler™ 1 kb DNA-Ladder

2.6 Peptide

Fusion Inhibitory Peptide (FIP; Z-D-Phe-Phe-Gly-OH)

Dieses von der Firma *Bachem* (Schweiz) bezogene Peptid inhibiert in Zellkulturen die Zell-Zell-Fusion nach stattgehabter MV-Infektion [203].

Der Buchstabe „Z“ steht in der Peptidkette für eine Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe am N-terminalen Ende zum Schutz von Aminogruppen.

2.7 Nährmedien und Seren

Fetal Calf Serum (FCS, Fetales Kälberserum)

Hersteller des fetalen Kälberserums ist die Firma *Invitrogen* (Karlsruhe). Vor erstmaligem Gebrauch ist dessen Inaktivierung nötig. Hierzu muss das Serum auf 56 °C für 30 min erhitzt werden. Danach kann es mehrere Wochen bei 4 °C gelagert werden.

Minimum essential medium (MEM)

Es wurde nach der von Eagle und Levin beschriebenen Zusammensetzung [204] eigens in der Medienküche des VIM hergestellt und bei 4°C zu 500 mL in Glasflaschen bereitgestellt. Vor dessen Verwendung wurden auf der

Sterilwerkbank 15 mL 5,6 % (w/v) NaHCO₃-Lösung sowie je nach Bedarf, verschiedene Mengen an FCS hinzugefügt (50 mL für 10 %iges MEM und 25 mL für 5 %iges MEM).

Doppel-MEM

MEM in doppelter Konzentration. Herstellung und Bereitstellung in der Medienküche des VIM, Würzburg.

Einfriermedium

90 % (v/v) FCS und 10 % (v/v) DMSO, VIM

LB-Medium

Um 1 L LB-Medium herzustellen wurden folgende Stoffe in angegebener Menge in eine 1 L-Glasflasche gefüllt:

Hefeextrakt	5 g
NaCl	5 g
Trypton	10 g

Anschließend wurde die Flasche mit dH₂O auf 1 L aufgefüllt und autoklaviert. Nachdem Abkühlen auf RT konnte es verwendet werden. Die weitere Aufbewahrung erfolgte bei RT.

LB-Medium mit Antibiotikaresistenz

In der vorliegenden Arbeit fanden zwei verschiedene Antibiotika Verwendung: Ampicillin und Kanamycin. Von den in pulverform vorliegenden Antibiotika erfolgte zunächst die Herstellung eines Antibiotikastockes. Dazu wurden je nach Antibiotikum unterschiedliche Mengen in 1 mL dH₂O gelöst (im Falle von Ampicillin 100 mg und von Kanamycin 30 mg). Das LB-Medium wurde gemäß angegebenem Protokoll (s.o.) hergestellt. Sobald das autoklavierte Medium auf Temperaturen von < 40 °C abgekühlt ist, kann der Antibiotikastock in einem

Mengenverhältnis von 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ LB-Medium zugegeben werden. Die Lagerung erfolgte ebenfalls bei RT.

LB-Agar mit Antibiotikaresistenz

Die Herstellung von 1 L Agar erfolgte analog zu der des LB-Mediums. Zu den oben angegebenen Mengen mussten zusätzlich 15 mg Bacto™ Agar (1,5 % (w/v); für 1 L = 15 g) hinzugegeben werden. Analog zu der Herstellung des LB-Mediums wurden für den Antibiotikastock 100 mg Ampicillin bzw. 30 mg Kanamycin in 1 mL dH_2O gelöst und zum LB-Agar in einem Mengenverhältnis von 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$ LB-Agar zugegeben, sobald dessen Temperatur $< 40\text{ }^\circ\text{C}$ angenommen hatte. Anschließend wurde der sich allmählich verfestigende Agar in Agarschalen gegossen. Nach dem endgültigen Wechsel in einen festen Aggregatzustand, konnten die Agarschalen mittels Deckel verschlossen und bei $4\text{ }^\circ\text{C}$ gelagert werden.

Overlay-Agar

Der Overlay-Agar fand seine Anwendung bezüglich Virustitrationszwecken. Für insgesamt 240 mL Overlay-Agar mussten 90 mL Doppel-MEM und 60 mL MEM (5 % FCS (v/v)) in einem Messzylinder vorgelegt werden. Anschließend wurden 90 mL 2 %igen Agars (w/v) in einem Erlenmeyerkolben in der Mikrowelle erhitzt, bis eine schlierenfreie Flüssigkeit entstand. Nachdem der Agar auf ca. $40\text{ }^\circ\text{C}$ abgekühlt war, konnte das vorgelegte MEM und Doppel-MEM zu dem Agar geschüttet werden. Der Erlenmeyerkolben wurde mit Aluminiumfolie verschlossen und bei $41\text{ }^\circ\text{C}$ im Wasserbad bis zur weiteren Verwendung aufbewahrt.

2.8 Lösungen und Puffer

Aqua destillata (Aqua dest., dH_2O)

VIM, Würzburg

DNA-Ladepuffer

Bromphenolblau 0,03 % (v/v), Glycerol 60 % (v/v), Na_2EDTA 60 mM, Tris-HCl 10 mM, Xylencyanol 0,03 % (v/v) ad aqua dest. und pH 7,6

FACS-Puffer

BSA 0,4 % (w/v), Natriumazid 0,02 % (w/v) in 1 L PBS⁽⁻⁾ gelöst

ATV

D-Glukose 5 mM, NaCl 137 mM, Na₄EDTA 200 mg/L, NaHCO₃ 70 mM, KCl 5,4 mM,
Trypsin 500 mg/L ad aqua dest.

VIM, Würzburg

PBS

8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,15 g/L Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,2 g/L KH₂PO₄, 0,167 g/L
CaCl₂ x 4

H₂O und 0,1 g/L MgCl₂ x 6 H₂O ad aqua dest. und pH 7,4

VIM, Würzburg

PBS⁽⁻⁾

8,0 g/L NaCl, 0,2 g/L KCl, 1,15 g/L Na₂HPO₄ x 2 H₂O, 0,2 g/L KH₂PO₄ ad aqua dest.
und pH 7,4

VIM, Würzburg

NTE-Puffer

EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, TRIS-HCl 10 mM ad aqua dest. und pH 7,4

Einfriermedium

10 % DMSO in FCS

Extraktionslösung des MTT-Tests

SDS 0,4 g, HCl 1 M 0,87 mL in 8,75 mL DMSO (100 %) gelöst

MTT-Lösung

12,5 mg Tetrazolium-Salz MTT in 5 mL PBS(-) gelöst

TAE-Puffer

2 M TRIS, 0,57 % (v/v) C₂H₄O₂, 0,6 M EDTA ad dH₂O und pH 8,0

Neutralrotlösung 1,6 % (w/v)

VIM, Würzburg

Triton X-100 0,25 % (v/v)

2,5 mL Triton X-100 in 1000 mL PBS⁽⁻⁾ gelöst

2.9 Antibiotika

Antibiotika	Stammlösung	Herkunft	
Ampicillin	100 mg/mL dH ₂ O	BioChemica, (Darmstadt)	AppliChem
Kanamycin	30 mg/mL dH ₂ O	BioChemica, (Darmstadt)	AppliChem

Tab. 2.5 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antibiotika und deren Konzentration in der Stammlösung

2.10 Antikörper

2.10.1 Primärantikörper

Antikörper	Antigen	Herkunft	
MAb F227	N-Protein des MV	S. Löffler, VIM, Würzburg	
THY 1.1-AK	CD 90.1	Klon Ox-7 von BD Pharmingen	

Tab. 2.6 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primärantikörper

2.10.2 Sekundärantikörper

Antikörper	Herkunft
Anti-Maus Alexa 488 (Ziege IgG (H+L))	Invitrogen (USA)
Anti-Maus Alexa 594 (Ziege IgG (H+L))	Invitrogen (USA)

Tab. 2.7 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sekundärantikörper

2.11 Chemikalien

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Agar für Plaquetests	Bacto™ Agar	VIM, Würzburg
Agar für Agarplatten	Bacto™ Agar	Becton Dickinson (Heidelberg)
Agarose		AppliChem (Darmstadt)
BDM		
BSA		AppliChem (Darmstadt)
CaCl ₂		Sigma-Aldrich (USA)
DAPI (4',6-Diamidin-2-phenylindol)		Invitrogen (USA)
DMSO		
EDTA		AppliChem (Darmstadt)
Ethanol absolut		AppliChem (Darmstadt)
Ethidiumbromid		Sigma-Aldrich (USA)
Handdesinfektionsmittel	Desderman® pure	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt)
Hefeextrakt	Bacto™ Yeast Extract	Becton Dickinson (Heidelberg)
HPLC-H ₂ O		AppliChem (Darmstadt)
Isopropanol (2-Propanol)		AppliChem (Darmstadt)
Kaliumchlorid (KCl)		Ferak (Berlin)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)		Merck (Darmstadt)
MTT-Lösung		
Natriumacetat		Ferak (Berlin)
Natriumazid (NaN ₃)		AppliChem (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)		AppliChem (Darmstadt)
Natriumhydrogencarbonat (NaHCO ₃) 5,6 % (w/v)		VIM, Würzburg

Natronlauge – Maßlösung (1 M)		AppliChem (Darmstadt)
Neutralrot		Merck (Darmstadt)
Paraformaldehyd (PFA)		Merck (Darmstadt)
Polyethylenimin (PEI)		Polyscience Inc. (USA)
Salzsäure-Maßlösung (1 M)		AppliChem (Darmstadt)
SDS		AppliChem (Darmstadt)
Terralin®	liquid	Schülke & Mayr GmbH (Norderstedt)
TRIS ultrapure		AppliChem (Darmstadt)
Triton X-100		Sigma Aldrich
Trypton		AppliChem (Darmstadt)

Tab. 2.8 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien

2.12 Enzyme

Enzym	Hersteller
Calf Intestine Alkalische Phosphatase (CIAP)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Shrimp Alkalische Phosphatase (SAP)	Fermentas (St. Leon-Rot)
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4 DNA-Ligase	Fermentas (St. Leon-Rot)
T4 Polynukleotid Kinase (PNK)	Fermentas (St. Leon-Rot)
PFU Ultra™ High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene (USA)

Tab. 2.9 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme

2.13 Restriktionsenzyme und deren Puffer

Alle verwendeten Enzyme und deren Puffer wurden von der Firma *Fermentas* (St. Leon-Rot) bezogen.

Restriktionsenzyme

Acc65 I	Hind III	Pvu II
Age I	Hpa I	Sac I
Bam HI	Mfe I	Sal I
Bgl II	Mhe I	Sma I
Bsr GI	Mlu I	Stu I
Eco RI	Nde I	Xba I
Eco RV	Pst I	Xho I

Tab. 2.10 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme

Puffer

10X Buffer Blue	10X Buffer Red
10X Buffer Green	10X Buffer for Bam HI
10X Buffer Orange	10X Buffer for Eco RI

Tab 2.11 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer für die Verwendung von Restriktionsenzymen

2.14 Kits

Bezeichnung	Verwendung	Hersteller
Amicon® Ultra-15	Ultrazentrifugation von lentiviralen Partikeln	Millipore (USA)
BigDye® Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit	Sequenzierung von DNA	Life Technologies (USA)
PuReTaq™ Ready-To-Go PCR Beads	PCR-Amplifikation von DNA	GE Healthcare (München)
Plasmid Maxi Kit	Maxipräparation von Plasmiden	Qiagen (Hilden)
QIAprep® spin Miniprep Kit	Minipräparation von Plasmiden	Qiagen (Hilden)
QIAquick® Gel Extraction Kit	Gelelution von DNA-Banden	Qiagen (Hilden)
QuickChange® R II Site Directed Mutagenesis Kit	Gerichtete Mutagenese von Plasmiden	Stratagene (USA)

Tab. 2.12 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kits

2.15 Verbrauchsmaterialien

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Autoklavierband	Steri-Klebeband Dampf	Hartenstein (Würzburg)
Agar-Schalen	n/a	Sarstedt (Nümbrecht)
Aluminiumfolie	Art.-Nr.: 0954.1	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Deckglaser (18 x 18 mm)	n/a	Superior
Dispenser-Tips	Multitips steril (5 mL, 12,5 mL, 25 mL)	Hartenstein (Würzburg)
Douncer/Homogenisator	n/a	B. Braun (Melsungen)
Durchflusszytometrierröhrchen	BD Falcon™ 5 mL Polystyrene Round-Bottom Tube	Becton Dickinson (Heidelberg)
Einmalhandschuhe	Proline® Nitril	Asid Bonz (Herrenberg)
	Flexam®	Cardinal Health (Dublin, Irland)
Einweg-Skalpelle	n/a	Ratiomed (München)
ELISA-Platten	MaxiSorp	Nunc™ (Langenselbold)
Gewebekulturschalen	Nunclon™ Surface	Nunc™ (Langenselbold)
Photometrieküvetten	n/a	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Kryokonservierungsröhrchen	Cryo.S™	greiner bio-one (Frickenhausen, Solingen)
Membranfilter	Minisart® (0,2 und 0,45 µm)	Sartorius AG (Göttingen)
Mund-Nasen-Schutz	n/a	Asid Bonz (Herrenberg)
Spritzen	Primo® (5 mL und 10 mL) Infuject® (50 mL)	Hartenstein (Würzburg) Hartenstein (Würzburg)
Parafilm	Parafilm® „M“	Pechiney Plastic Packaging (Chicago, USA)
Pipetten	Reference	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen	Kristall kurz (0,5 - 10 µL)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)

	Multi® UNIVERSAL (1-200 µL)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
	Pipettenspitzen blau (100 - 1000 µL)	Eppendorf (Hamburg)
Pipettenspitzen steril	Cellstar®	greiner bio-one (Frickenhausen, Solingen)
Reaktionsgefäße	Safe-Lock-Tube (1,5 mL und 2,0 mL)	Eppendorf (Hamburg)
Tissue-Softtücher	Starline®	Igefa (Ahrensfelde OT Blumberg)
Zellkulturflaschen	Cellstar® (25 cm ² , 75 cm ² , 175 cm ²)	greiner bio-one (Frickenhausen, Solingen)
Zellkulturplatten	Cellstar® (6, 12, 24, 48 wells)	greiner bio-one (Frickenhausen, Solingen)
Zellstofftücher	Basic 140004, 25 x 23 cm	Satino
Zentrifugenröhrchen	Cellstar® Tubes (15 mL und 50 mL)	greiner bio-one (Frickenhausen, Solingen)

Tab 2.13 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien

2.16 Glasmaterialien

Bezeichnung	Größen	Hersteller
Erlenmeyerkolben	100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL	Schott (Mainz)
Glasflaschen	100 mL, 250 mL, 500 mL, 1000 mL	Schott (Mainz)
Messkolben	50:1 mL, 100:1 mL, 250:2 mL	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Reagenzgläser		Schott (Mainz)

Tab. 2.14 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Glasmaterialien

2.17 Geräte

Bezeichnung	Produktname	Hersteller
Autoklav	Autoklav 23	Melag (Berlin)
Bakterienschüttler	Certomat® H und Certomat® R	B. Braun (Melsungen)
<u>Brutschränke</u>		
Zellkultur	Typ 5060 EK/CO2 und Kelvitron®t	Heraeus (Hanau)
Bakterien	B 60 30	Heraeus (Hanau)
Durchflusszytometer	FACSCalibur	Becton-Dickinson (Heidelberg)
Durchlichtmikroskop	DMIL	Leica (Solms)
Eismaschine	AF30	Scotsman (Italien)
<u>Elektrophoresezubehör</u>		
Gelkämme	Hergestellt im Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg	
Gelkammer	Hergestellt im Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg	
Gelwanne	Hergestellt im Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg	
Netzgerät	E455	Consort (Belgien)
UV-Transilluminator	Gel Jet Imager	Intas (Göttingen)
UV-Lichteinheit	VL - 4LC	Vilber Lourmat (Eberhardzell)
ELISA-Reader	BEP® 200	Siemens (München)

Material

Fluoreszenzmikroskop	DMIRE 2	Leica (Solms)
Digitalkamera	DC 300F	Leica (Solms)
Netzgerät	ebq 100 isolated	Leica (Solms)
Gelträger	Hergestellt im Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg	
Glasarbeitsplatte	Hergestellt im Institut für Virologie und Immunbiologie, Würzburg	
Handzähler	n/a	Tamaco (Taiwan)
	n/a	Baumer Ivo GmbH & Co. KG (Villingen-Schwenningen)
Handpipette elektrisch	Accu-jet® und Accu-jet® pro	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
<u>Kühl- bzw. Gefrierschranke</u>		
4 °C und -20 °C	Sikafrost comfort electronic	Siemens (München)
-80 °C	n/a	Revco, Thermo Scientific (Langenselbold)
Laborwaage	EW3000-2M	Kern & Sohn GmbH (Balingen)
Magnetheizrührer	Ikamag RCT	IKA Labortechnik (Staufen)
Mehrkanalpipette	HandyStep®	Brand GmbH & Co. KG (Wertheim)
Mikropipette	pipetman	Gilson (USA)
	Reference®	Eppendorf (Hamburg)
Mikrowellengerät	DBP HF00125A U	Panasonic (Hamburg)
PCR-Cycler	Mastercycler gradient	Eppendorf (Hamburg)
Photometer	BioPhotometer	Eppendorf (Hamburg)
Drucker des Photometers	DPU-414	Seico Instruments Inc.

		(Pakistan)
pH-Meter	FiveEasy™ 20	Mettler Toledo AG (Gießen)
Sequenziergerät	ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer	Advanced Biolab Service (München)
Standzentrifugen	Rotixa KS, Rotanta 460 R, Rotanta 420 R	Hettich (Tuttlingen)
Sterilwerkbank	BSB 4A	Gelaire (Australien)
Taschenrechner		Casio (Norderstedt)
Thermoblöcke	Thermostat 5320	Eppendorf (Hamburg)
	Liebisch 2099/DA	Gebr. Liebisch GmbH & Co. KG (Bielefeld)
Tischzentrifugen	Biofuge 13, Biofuge fresco	Heraeus (Hanau)
	Millifuge - Millipore	Hittachi Koki Co., Ltd. (Japan)
Ultrazentrifuge	Sorvall® Discovery™ 90SE	Hitachi (USA)
Vortexer	Vortex-Genie 2	Bender + Hobein AG
Wasserbad	3041 (Typennummer)	Köttermann (Uetze/Hänigsen)
Wippschüttler	WS 5	Edmund Bühler (Tübingen)
Zählkammer	Thoma neu	Superior Marienfeld (Lauda-Königshofen)

Tab. 2.15 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte

2.18 Software

Verwendung	Produktname	Hersteller
Auswahl von RNAi-Sequenzen	iRNAi v2.0	Mekentosj B.V. (Niederlande)
Betriebssystem	Windows Vista	Microsoft® (USA)
	Windows 7	Microsoft® (USA)
Bildbearbeitung	Photoshop v8.0.1	Adobe® (USA)

Datenauswertung	Microsoft® Excel 2007	Microsoft® (USA)
	Microsoft® Excel 2010	Microsoft® (USA)
DNA-, RNA-Auswertungen	Lasergene v7.0	DNASTAR (USA)
Durchflusszytometrie	Lysis II™	Becton Dickinson (Heidelberg)
	FlowJO v7.6	Tree Star (USA)
Textverarbeitung	Microsoft® Word 2007	Microsoft® (USA)
	Microsoft® Word 2010	Microsoft® (USA)

Tab. 2.16 | Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Software

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Kultivierung adhärenter Zelllinien

Die verwendeten Zellen wurden im Brutschrank bei 37°C mit einer Begasung von 95 % (v/v) Luft und 5 % (v/v) CO² in Zellkulturflaschen verschiedener Größe (Kap. 2.15) mit folgenden Medien kultiviert:

293T-Zellen	MEM mit 10% FCS
HeLa-Zellen	MEM mit 5% FCS
Vero-Zellen	MEM mit 5% FCS
NT-2-Zellen	DMEM mit 10% FCS (Vermehrungsphase) DMEM mit 2% FCS (Kultivierungsphase)

Alle verwendeten Zellen gehören zur Gruppe von adhärent wachsenden Zelllinien. Sie vermehren sich am Boden der Gewebekulturflasche in Form eines konfluenten Zellrasens (*Monolayer*). Sobald die Zellen 80 - 90 % des Flaschenbodens bedeckt haben, ist es erforderlich sie zu splitten. Hierfür wurde das gesamte Medium, das die Zellen überlagerte, aus den Flaschen entnommen und anschließend 10 mL ATV mit einer Temperatur von 37 °C in die Flasche pipettiert. Die Zellen wurden dann durch vorsichtiges Schwenken gewaschen. Danach erfolgte die Entnahme des Großteiles an ATV (8 mL bei Flaschen der Größe 125 cm², 9 mL bei Flaschen der Größe 75 cm² und 9,5 mL bei Flaschen der Größe 25 cm²). Im Regelfall lösten sich die Zellen innerhalb der nächsten 5 min unter gelegentlich Klopfen der Flasche gegen die Handfläche vom Flaschenboden. Die abgelösten Zellen wurden nun, je nach Bedarf, mit auf 37°C vorgewärmtem frischem Zellkulturmedium 1:5 bis 1:10 in der Zellkulturflasche resuspendiert.

3.1.2 Zellzählung

Die adhärent wachsenden Zellen werden zunächst mittels ATV von der Oberfläche der Zellkulturflaschen gelöst (s. Kap. 3.1.1), nach Zugabe von Zellkulturmedium in ein Falcon überführt und anschließend so lange invertiert, bis eine homogene

Zellsuspension entstanden war. Die Zählung erfolgte mithilfe gläserner Zählkammern mit einer *Einteilung nach Thoma*, auf die ein Deckgläschen platziert wurde. In den Raum zwischen Deckgläschen und Zählkammer wurden 10 µL der Zellsuspension pipettiert. Mit Hilfe eines Lichtmikroskopes mit 20-facher Vergrößerung wurden alle Zellen, die sich innerhalb der insgesamt 16 Gruppenquadrate befanden, gezählt.

Die Zellzahl pro mL erhält man durch die Anwendung folgender Formel:

$$\frac{n \cdot 10^4}{\text{mL}} = x/\text{mL}$$

n = mittels Zählkammer gezählte Zellen

3.1.3 Konservierung eukaryotischer Zellen

In den durchgeführten Untersuchungen war es notwendig Zelllinien zu Konservationszwecken tiefgefroren zu lagern. War das Ziel eine längerfristige Lagerung, wurde die Kryokonservierung in flüssigem Stickstoff durchgeführt. Sollten die Zellen lediglich für drei oder vier Monate aufbewahrt werden, empfahl sich die Tiefkühlagerung bei -80 °C. Um die Zellen einzufrieren wurden sie mit ATV-Lösung vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst, in Falcons überführt und bei 1200 rpm für 10 min abzentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und verworfen. Anschließend erfolgte die Resuspendierung des verbliebenen Zellpellets in 2 mL Einfriermedium und die Überführung in auf -20 °C vorgekühlte Kryoröhrchen. Diese wurden zunächst 2 h bei -20 °C zwischengelagert und im Folgenden bei -80°C gelagert. Wahlweise kann nach einer mind. 24-stündigen Lagerung bei -80 °C die Überführung in flüssigen Stickstoff erfolgen.

Zum Auftauen wurden die in kryokonservierten Zellen in 37°C warmem Wasser aufgetaut. Sobald der Inhalt des Kryoröhrchens einen flüssigen Zustand angenommen hatte, konnten die Zellen in ein mit 10 mL frischen Zellkulturmedium gefülltes Falcon überführt werden. Dieses wurde mit 1200 rpm 5 min bei RT zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, sowie die Zellen in 10

mL frischen Zellkulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche von 25 cm² Größe pipettiert. Die Zellen konnten nun zur weiteren Verwendung gemäß Kap. 3.3.1 in Kultur gehalten werden.

3.1.4 Transfektion

Transfektion bezeichnet den Vorgang mit Hilfe geeigneter Transfektionsmedien Plasmid-DNA in den Intrazellulärraum eukaryotischer Zellen zu überführen. Gene die in diese Plasmide kloniert wurden, können auf diese Weise in diesen Zellen exprimiert werden. In dieser Arbeit wurden die Transfektionsmedien *Polyethylenimin (PEI)* der Firma *Polyscience (USA)* und Calciumphosphat verwendet.

3.1.4.1 Transfektion mit *PEI*

PEI liegt in wässriger Form als Polykation vor und besitzt die Fähigkeit negativ geladene DNA zu komplexieren. Diese Komplexe lagern sich an Zellmembranen an, um diese in einem zweiten Schritt zu überwinden und somit in das Zellinnere zu gelangen.

Die zu transfizierenden Zellen wurden in 6-well-Platten ausgesät und mit 2 mL Medium überlagert. Sobald sich ein Monolayer gebildet hatte, der ca. 80 – 90 % des Flaschenbodens bedeckte, wurde der Transfektionsansatz, bestehend aus Plasmid-DNA und *PEI*, hinzupipettiert. Zur Herstellung des Transfektionsansatzes wurde die gewünschte Menge an Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß gegeben und dieses mit 150 mM NaCl-Lösung auf ein Gesamtvolumen von 150 µL aufgefüllt. In ein zweites Reaktionsgefäß wurde die 2,5-fache Menge in µL der in µg verwendeten DNA-Menge gegeben und ebenfalls mit 150 mM NaCl-Lösung auf insgesamt 150 ml aufgefüllt. Der gesamte Inhalt des DNA-enthaltenden Caps wurde anschließend in das *PEI* enthaltende Reaktionsgefäß überführt, gevortext und anschließend für 10 sec via *Millifuge*® abzentrifugiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 30 min. Anschließend wurde das Medium von den Zellen abgezogen und der gesamte Transfektionsmix vorsichtig tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert. Die Zellen wurden mit 1 mL des entsprechenden Mediums überdeckt und für 2 h im Brutschrank inkubiert. Anschließend konnte das Medium

von den Zellen abgezogen und durch 2 mL des entsprechenden Mediums ersetzt werden. Die weitere Kultivierung erfolgte im Brutschrank.

3.1.4.2 Transfektion von Zellen mit Calciumphosphat

Analog zu den Transfektionen mit *PEI* wurden ebenfalls 6-well-Platten verwendet, in denen die Zellen mit 2 mL Medium überdeckt waren. Sobald die Zellen zu 80 – 90 % konfluent waren, konnte die gewünschte Menge an Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß überführt und mit ddH₂O auf 0,5 mL aufgefüllt werden. Zu diesem Ansatz wurden 0,5 mL 2xHBS hinzugegeben und der Reaktionsmix kurz gevortext. Dazu wurden 50 µL einer 2,5 M CaCl₂-Lösung gegeben, der Ansatz kurz gevortext und anschließend für 10 sec mit der *Millifuge*® abzentrifugiert.

Nach einer Inkubationszeit von 30 min wurde das Medium von den zu transfizierenden Zellen abgenommen und der Transfektionsmix tröpfchenweise auf die Zellen pipettiert und anschließend 1 mL des entsprechenden Mediums zugegeben. Es erfolgte ein weiterer Mediumwechsel nach 8 h.

3.1.5 Durchflusszytometriemessungen (FACS-Analyse)

Mithilfe des „*Fluorescence activated cell scanner*“ (*FACS*) können Zellen mittels emittierter Laserstrahlen anhand morphologischer Kriterien wie Zellgröße im „*forward-scatter*“ (*FSC*) und Granularität im „*side-scatter*“ (*SSC*), Antikörperfärbungen oder Intrazellulärfärbungen unterschieden und anschließend durch geeignete Software ausgewertet werden.

Vor den Messungen ist es notwendig die Zellen entsprechend zu präparieren. Zunächst wurde das gesamte Medium der in Kultur befindlichen Zellen entfernt und mit PBS⁽⁻⁾ zweimalig gewaschen, wonach sich die Lösung der Zellen vom Flaschenboden durch ATV anschloss. Pro Messung war es notwendig eine Zellzahl von mindestens 3×10^4 Zellen zur Verfügung zu haben. Die abgelösten Zellen konnten nun in FACS-Röhrchen überführt werden, in die zuvor 1 mL FACS-Puffer pipettiert wurde. Die Röhrchen wurden samt Inhalt bei 1200 rpm über 5 min bei 4 °C zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgezogen und das Pellet in 50 – 200 µl FACS-Puffer resuspendiert. Die Messung der Proben erfolgte anschließend mit dem Durchflusszytometer *FACScan*TM. Die Rohdaten wurden

mittels der Software *Lysis IITM* erhoben und mithilfe der Software *FlowjoTM 7.2.2* quantitativ ausgewertet.

3.1.6 *MTT*-Vitalitätstest

Grundlage dieses Testes ist die Aufnahme von *Tetrazolium-Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT)* in vitalen Zellen und solchen, die kurz vor der Apoptose stehen. Im Zellinneren kann es im Falle eines aktiven Zellstoffwechsels in das violette Reaktionsprodukt *Formazan* reduziert werden. Die Reduktion ist vornehmlich abhängig von den pyridinhaltigen Reduktionsäquivalenten *NADH* und *NADPH*. Somit entspricht die Menge des gebildeten Formazans der Glykolyserate einer Zelle [205]. *Formazan* aggregiert in der Zelle zu Kristallen, welche die Zelle nicht mehr verlassen können, jedoch mittels eines organischen Lösungsmittels solubilisiert und im Anschluss durch enzymatische Farbreaktionen (*ELISA*) gemessen und ausgewertet werden können.

Der *MTT*-Vitalitätstest wurde im Vorfeld des Tests des *RNAi*-Indikatorsystems durchgeführt, mit der Zielsetzung, mögliche zytotoxische Effekte von *siRNAs* bzw. *shRNAs* auf die transfizierten Zellen zu eruieren. Diesbezüglich wurden 1×10^6 293T-Zellen am Vortag in 6-well-Platten ausgesät und ÜN im Brutschrank inkubiert. 24 h später erfolgte die Transfektion der Zellen mit den verschiedenen *shRNA* exprimierenden Vektoren (s. Kap. 3.1.4). Weitere 24 h später wurde das sich auf den Zellen befindende Zellkulturmedium abgezogen und durch 750 μL *MTT*-Lösung ersetzt. Durch die Umsetzung des Tetrazolium-Salzes zeigten die behandelten Zellen einen Farbumschlag von gelb in violett. Daran schloss sich eine weitere Inkubationszeit von 2 h im Brutschrank an. Anschließend wurde die *MTT*-Lösung komplett entfernt und durch 750 μL einer Extraktionslösung ersetzt, die für weitere 45 min auf den Zellen belassen werden musste. Im Anschluss wurden die insgesamt 750 μL eines wells in ein Reaktionsgefäß pipettiert und je 50 μL der Lösung in wells einer 96-well-Platte pipettiert. Die Auswertung im *ELISA*-Reader erfolgte bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenzwellenlänge 620 nm). Es wurde dann der Mittelwert aus den insgesamt 12 Einzelwerten pro getesteter Probe gebildet. Als Kontrolle dienten außer untransfizierten 293T-Zellen zusätzlich nur mit *PEI* behandelte Zellen.

3.2 Histochemische Methoden

3.2.1 Immunfluoreszenzfärbung für durchflusszytometrische Messungen

Zunächst erfolgte die Lösung der adhärennten Zellen mithilfe von ATV vom Boden der Zellkulturflaschen. Die gelösten Zellen wurden in ein 5 ml-Falcon überführt und 2×10^5 Zellen in ein mit 2 mL FACS-Puffer gefülltes FACS-Röhrchen überführt. Dieses wurde 5 min mit 1200 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der FACS-Puffer konnte anschließend vollständig vom sich am Boden des Röhrchens befindenden Pellet abpipettiert und die Zellen 100 µL in FACS-Puffer aufgenommen werden, in dem der Primärantikörper in einer 1:100 Verdünnung vorlag. Der Ansatz wurde kurz gevortext und 1 h bei 4 °C inkubiert. Anschließend wurden 2 mL FACS-Puffer hinzupipettiert und der Ansatz 5 min mit 1200 rpm bei 4 °C zentrifugiert und der FACS-Puffer anschließend abgesogen. Dieser Waschschrift wurde einmalig wiederholt. Zu dem Pellet wurden 100 µL FACS-Puffer, in dem der Zweitantikörper wiederum in einer Verdünnung von 1:100 vorlag, hinzupipettiert und kurz gevortext. Der Ansatz wurde 45 min unter Lichtkarenz auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden gewaschen, indem zwei Mal hintereinander 2 mL FACS-Puffer zu den Zellen hinzupipettiert und das FACS-Röhrchen anschließend zentrifugiert wurde (5 min, 1200 rpm, 4 °C). Das Pellet wurde in 350 µL FACS-Puffer aufgenommen und durchflusszytometrisch ausgewertet.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren

Die Konzentration einer Nukleinsäure in einer Probe wurde photometrisch bei einer Wellenlänge von 260 nm bestimmt.

Hierbei wurden in einem Reaktionsgefäß 3 µL der zu messenden DNA mit 60 µL aqua dest. vermischt und in Kunststoffküvetten überführt. Die Konzentration der zu bestimmenden Nukleinsäure kann dann im Photometer gemessen werden.

Durch eine zusätzliche Messung mit einer Wellenlänge von 280 nm ist es möglich den Reinheitsgrad der Probe zu ermitteln.

Der Quotient OD_{260}/OD_{280} sollte in dem Bereich zwischen 1,8 und 2,0 liegen.

Werte darüber machen eine Kontamination mit RNA wahrscheinlich. Werte

darunter legen eine Verunreinigung der Probe mit Proteinen oder aromatischen Substanzen nahe.

3.3.2 Agarose-Gelelektrophorese

Mithilfe der Gel-Elektrophorese ist es möglich Nukleinsäuren in einem elektrischen Feld der Größe nach aufzutrennen. DNA ist negativ geladen und bewegt sich in diesem in Richtung der Anode. Kleinere Nukleinsäurefragmente bewegen sich hierbei mit einer höheren Geschwindigkeit durch die Agarosegelmatrix als größere Fragmente und können somit nach entsprechender Zeit voneinander separiert werden.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich in 1 %ige (w/v) TAE-Agarosegele verwendet. Das Agarosepulver wurde in einem Erlenmeyerkolben mit der entsprechenden Menge TAE-Puffer gemischt und in einem Mikrowellengerät unter zwischenzeitlichem Schwenken erhitzt, bis eine schlierenfreie, homogene Flüssigkeit entstanden war. Der Erlenmeyerkolben mit darin befindlichem flüssigem Agarose-Gel wurde mit Leitungswasser auf 50 – 60 °C abgekühlt und mit 1 µg/mL Ethidiumbromid versetzt. Das Gel konnte nun in einen Gelträger gegossen und daraufhin ein Kamm zur Aussparung der Geltaschen eingesetzt werden. Nach Erstarren des Gels wurde es in eine mit TAE gefüllte Kammer überführt und war somit bereit beladen zu werden.

Entsprechende Mengen an DNA wurden in aqua dest. gelöst, zusätzlich mit DNA-Laufpuffer versetzt und anschließend in die Taschen pipettiert. Die DNA-Fragmente konnten nun durch Anlegen einer Spannung von 90 – 115 V und einer Stromstärke von 500 mA der Größe nach aufgetrennt werden. Nach 1,2 h kann durch das interkalierende Ethidiumbromid DNA unter UV-Licht (366 nm) sichtbar gemacht und fotografiert werden.

3.3.3 Isolierung von DNA-Fragmenten aus Agarosegelen (*QIAquick® Gel Extraction Kit*)

Zunächst erfolgte die Auftrennung der DNA-Banden mittels Agarose-Gelelektrophorese (Kap. 3.3.2). Mit Hilfe eines Einmal-Skalpells wurden die entsprechenden DNA-Banden unter UV-Licht (256 nm) aus dem Agarosegel

geschnitten und in bereitgestellte Reaktionsgefäße überführt. Die Reaktionsgefäße wurden in einem vorherigen Schritt gewogen, um ihr Leergewicht zu bestimmen.

Um das Gewicht des Agarose-Gelstückes zu bestimmen wurden die Reaktionsgefäße samt Inhalt ein weiteres Mal gewogen und die Differenz zum Leergewicht berechnet. Für jedes mg des Agarosegelstückes wurden 3 μL des QG-Puffers zugegeben, das Reaktionsgefäß für 10 min bei 50 °C inkubiert und anschließend gevortext. Das Gelstück sollte sich zu diesem Zeitpunkt vollständig im Puffer gelöst und die entstandene Flüssigkeit eine gelbe Farbe angenommen haben. Im Falle eines eher violetten Farbtons müssen 10 μL einer 3 M Natriumacetat-Lösung zugegeben werden um die Probe in den gewünschten pH-Bereich zu titrieren. Zugabe von Isopropanol (1 mg Agarose-Gelstück \cong 1 μL Isopropanol). Alle im Folgenden aufgeführten Zentrifugationen mussten laut Herstellerangaben 1 min bei 13000 rpm durchgeführt. Die Probe wurde nun in im Kit enthaltene DNA-bindende Säulen pipettiert und zentrifugiert. Der Durchfluss wurde verworfen und 500 μL des QG-Puffers auf die Säule aufgetragen und nochmals zentrifugiert, um Agarosereste aus der Säulenmatrix zu entfernen. In einem nächsten Schritt wurde die Säule durch Zugabe von 750 μL PE-Puffer mit anschließender Zentrifugation gewaschen. Die Säule wurde nun auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt, 50 μL des Elutionpuffers direkt auf die Säulenmatrix pipettiert und für 1 min bei RT inkubiert. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt konnte die Konzentration des Eluats mit dem Photometer bestimmt werden.

3.3.4 Transformation kompetenter Bakterien mit Plasmid-DNA

Transformation bezeichnet die nicht-virale Aufnahme von freier DNA in kompetente Bakterienzellen sowie in Pilze, Algen, Hefen und Pflanzen. Für die Transformation von Plasmid-DNA wurden in der vorliegenden Arbeit kompetente Bakterien des Stammes *E. coli XL-10 Gold* verwendet.

Die Lagerung erfolgte aliquotiert in Kryokonservierungsröhrchen bei -80 °C. Sie wurden auf Eis aufgetaut und parallel die im Folgenden benötigten Reaktionsgefäße auf Eis vorgekühlt. Nach dem vollständigen Auftauen wurden 50 μL der Bakterien und 1 μL Plasmid-DNA in ein Reaktionsgefäß pipettiert und für

30 min auf Eis inkubiert. Anschließend erfolgte der direkter Transfer in einen auf 42 °C vorgeheizten Heizblock (*Hitzeschock*) und die dortige Inkubation für 2 min. Danach wurden die Reaktionsgefäße wieder 5 min lang auf Eis abgekühlt. Zu den transformierten Bakterien wurden anschließend 950 µL auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium gegeben und davon 30 µL auf eine Agarselektionsplatte (je nach plasmidkodierter Antibiotikaresistenz) ausgestrichen. Nachdem diese getrocknet war erfolgte der Transfer der Platten in den Bakterienbrutschrank, in welchem sie bei 37 °C ÜN bebrütet wurden.

3.3.5 Restriktionsverdau von DNA

Nukleinsäure abbauende Enzyme werden als Nukleasen bezeichnet. Restriktionsendonukleasen zeichnen sich dadurch aus, doppelsträngige DNA sequenzspezifisch zu erkennen und zu spalten. Die erkannten Sequenzen bestehen aus mindestens vier Basen, die durch eine palindromische Struktur gekennzeichnet sind. Bei der Spaltung von DNA können DNA-Fragmente mit glatten (*blunt-end*) oder überhängenden Enden (*sticky-end*) entstehen. Der Restriktionsverdau diente zu analytischen Kontrollen oder präparativen Zwecken, wie etwa Klonierungen.

In ein Reaktionsgefäß wurden folgende Mengen eingesetzt:

1	µg	DNA-Template
5	U	Enzym
2	µL*	Puffer
ad 20	µL	aqua dest.

Anschließend wurde der Ansatz 1 Stunde bei 37 °C inkubiert.

* $m_{\text{puffer}} = (m_{\text{Gesamtansatz}})^{-10}$

3.3.6 Gezielte Mutagenese (*QuickChange® II Site-Directed Mutagenesis Kit*)

Durch die gezielte Mutagenese ist es möglich die Basenfolge innerhalb eines Plasmids durch ein Einfügen von Mutationen zu ändern. Dazu müssen PCR-Primer so gewählt werden, dass sie in deren Mitte die gewünschte Basenabfolge tragen, jedoch an den Randbereichen mit der Basensequenz des zu verändernden DNA-Stranges übereinstimmen. Wird nun eine PCR durchgeführt, entstehen multiple Amplifikate der die Mutation tragenden DNA. Das Plasmid, in welches die Mutation eingefügt werden soll ist methyliert und kann durch die Endonuklease *DpnI*, die die Fähigkeit besitzt nur methylierte DNA zu schneiden, degradiert werden. Das Plasmid mit der eingebrachten Mutation kann nun in Bakterien transformiert, mittels Mini-Präparation isoliert und anschließend durch entsprechende Primer auf die eingebrachte Mutation hin untersucht werden.

Für die PCR wurde folgender Ansatz verwendet:

5	μL	10X Reaktionspuffer
1,25	μL	125 ng Forward Primer $\left[\frac{100 \text{ ng DNA}}{\mu\text{L HPLC} - \text{H}_2\text{O}} \right]$
1,25	μL	125 ng Reverse Primer $\left[\frac{100 \text{ ng DNA}}{\mu\text{L HPLC} - \text{H}_2\text{O}} \right]$
1	μL	dNTP (10 mM)
x	μL	5 - 50 ng des dsDNA Templates
ad 50	μL	HPLC-H ₂ O

1	μL	<i>PfuUltra Polymerase</i> $\left[\frac{2,5 \text{ U}}{\mu\text{L}} \right]$
---	----	---

Der Reaktionsansatz wurde anschließend im PCR-Cycler mit folgendem Programm amplifiziert:

1 x	95 °C, 30 Sekunden
12 x	95 °C, 30 Sekunden (Denaturierung)
	55 °C, 1 Minute (Annealing)
	68 °C, 5 Minuten* (Polymerisation)

Am Ende der Polymerisation wurde die Probe 2 min auf Eis gestellt und zu dem PCR-Ansatz 1 µL des Enzyms *DpnI* hinzupipettiert, der Ansatz kurz gevortext und dann mittels Tischzentrifuge kurz abzentrifugiert. Anschließend wurde die Probe bei 37 °C ÜN enzymatisch verdaut. Tags darauf wurden *XL1-Blue superkompetente Zellen* auf Eis aufgetaut und 50 µL in ein Reaktionsgefäß pipettiert. 1 µL der mit *DpnI* behandelten DNA wurde hinzupipettiert und 30 min auf Eis belassen. Anschließend folgte ein 45-sekündiger Hitzeschock bei 42 °C im Heizblock. Die Probe wurde danach wieder für 2 min auf Eis gestellt. In den Ansatz wurden 500 µL auf 37 °C vorgewärmtes LB-Medium hinzupipettiert und die Probe 1 h bei 37 °C im Bakterienschüttler geschüttelt. Aus dieser Kultur wurden 50 µL auf Kanamycin beinhaltende Agarplatten aufgebracht, diese anschließend bei 37 °C im Bakterienbrutschrank ÜN bebrütet, die tags darauf entstandenen Kolonien mittels Pipettenspitzen gepickt und die nach einer Minipräparation gewonnene DNA sequenziert (Kap. 3.3.15), ob die gewonnenen Plasmide Träger der Mutation waren.

* Die notwendige Dauer des Polymerisationsschrittes richtet sich nach

$t = \left[\frac{1 \text{ min}}{\text{Länge des DNA – Templates in kb}} \right]$. Da in der vorliegenden Arbeit lediglich *pDsRed2-C1* (bp \approx 4,7 kb) der Mutagenese zugeführt wurde, ist eine Dauer von 5 Minuten angegeben.

3.3.7 Ligation von DNA-Fragmenten

Ligationen wurden durch das Enzym *T4 DNA-Ligase* katalysiert, wobei je zwei Versuchsansätze angesetzt wurden, die sich in ihrem molaren Verhältnis von Vektor zu Insert in 1:1 und 1:10 unterschieden.

In einem ersten Schritt wurde der Zielvektor mittels den entsprechenden Restriktionsenzymen zunächst linearisiert (Kap. 3.3.5), per Agarose-

Gelelektrophorese separiert (Kap. 3.3.2) und zuletzt daraus eluiert (Kap. 3.3.3). Um eine Religation der Vektorenden zu verhindern, wurden das 5'-Ende des Vektors mit Phosphatasen dephosphoryliert (Kap. 3.3.11) und die Probe mittels Ethanolpräzipitation (Kap. 3.3.10) aufgereinigt.

Für den eigentlichen Versuchsansatz einer Ligation wurden dann folgende Mengen eingesetzt:

x	μL	DNA _{Vektor}
x	μL*	DNA _{Insert}
3	μL	Ligationspuffer
1	μL	T4 Ligase [5 U]
add	30 μL	dH ₂ O

* $m_{DNA_{Insert}}$ auch variierend aufgrund $DNA_{Vektor}/DNA_{Insert} = 1/1$ oder $1/10$

Der Versuchsansatz wurde ÜN bei 4 °C inkubiert und danach in mittels o.g. Schema in kompetente Bakterien transformiert. Als Kontrolle diente ein Versuchsansatz, der eine Religation allein des Vektorfragments katalysieren sollte. Im Anschluss wurde der gesamte Ansatz in *XL10 Gold-Bakterien* transformiert.

3.3.8 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die von *Kary Mullis* entwickelte Methode [206] dient der Vervielfältigung oder dem Nachweis einzelner DNA-Sequenzen in einem cDNA-Gemisch. Die durch zwei Primer an *sense*- und *antisense-Strang* eingerahmte DNA wird in mehreren Zyklen durch hitzestabile DNA-Polymerasen vervielfältigt. In einem ersten Schritt werden die Wasserstoffbrückenbindungen des zu DNA-Doppelstranges durch Erhitzen voneinander getrennt (denaturiert). Bei der folgenden Absenkung der Temperatur können sich die Primer an die nun getrennten DNA-Stränge komplementär anlagern. Die DNA-Polymerasen verlängern nun den als Matrize dienenden DNA-Einzelstrang. Die Folge ist die Entstehung eines neuen komplementären DNA-Stranges. Diese Schritte werden 30 – 40 mal wiederholt, wobei die bereits

entstandenen DNA-Stränge stets verdoppelt werden. Die Anzahl der Kopien kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$(2^n - 2n) \cdot x$$

Für einen PCR-Reaktionsansatz wurden folgende Mengen eingesetzt:

0,1	µg	DNA
1,0	µL	Forward-Primer
1,0	µL	Reverse-Primer
add 25,0	µL	dH ₂ O

Der Ansatz wurde gevortext und anschließend kurz mittels Tischzentrifuge abzentrifugiert. Danach wurde dem Reaktionsansatz ein *puReTaq Ready-To-Go PCR bead* beigemischt und das Reaktionsgefäß in den Thermocycler gestellt.

Es wurde folgende Reaktionsfolge programmiert:

1 x:	94 °C, 2 Minuten	(Denaturierung)
	53 °C, 1 Minute	(Annealing)
	72 °C, x Minuten*	(Elongation)
30 – 40 x:	94 °C, 30 Sekunden	(Denaturierung)
	53 °C, 1 Minute	(Annealing)
	72 °C, x Minuten	(Elongation)
1 x:	72 °C, 7 Minuten	(End-Elongation)

* s. 3.3.6

3.3.9 Herstellung von *shRNA*-Oligos

Die in Kap. 2.5.1 angegebenen DNA-Oligonukleotide wurden von der Firma *Sigma-Aldrich (Darmstadt)* bezogen. Um sie kompetent für die Klonierung in einen

Expressionsvektor zu machen, mussten zunächst zwei Schritte durchgeführt werden:

1. Annealing von Forward- und Reverse-Strang der DNA-Oligonukleotide
2. Phosphorylierung der zusammengeführten DNA-Oligonukleotide an deren 5'-Ende

Sobald diese Schritte durchgeführt sind, können die dsDNA-Fragmente in den Expressionsvektor *pF6gW* kloniert werden.

Der Reaktionsansatz zum Annealing der Oligonukleotide benötigt folgende Mengen der angegebenen Stoffe:

3,0 µL	5' Oligo (100 µM)
3,0 µL	3' Oligo (100 µM)
0,5 µL	NaCl (3 M)
2,0 µL	MgCl ₂ (1 M)
2,0 µL	Tris (pH 7,5; 1M)
ad 20 µL	TE-Puffer

Die Reaktionsgefäße wurden in einem auf 96 °C vorgewärmten Heizblock 5 min erhitzt (*Denaturierung*). Anschließend wurden sie in einem zweiten Heizblock auf eine Temperatur von 80 °C abgekühlt und 1 h bei dieser Temperatur inkubiert (*Annealing*). Danach wurden sie für 10 Minuten auf Eis abgekühlt. Anschließend erfolgte die Aufreinigung des Ansatzes mittels einer Ethanolfällung (Kap. 3.3.10). Das Pellet wird anschließend in 5 µL dH₂O gelöst.

In Schritt zwei werden die zuvor gewonnenen dsDNA-Fragmente zu folgendem Reaktionsansatz hinzugefügt:

5 μL	dsDNA-Fragmente
2 μL	T4 Ligase Puffer
1 μL	T4 Polynukleotid Kinase $\left[10\text{u}/\mu\text{L}\right]$
ad 20 μL	dH ₂ O

Dieser Ansatz wird für 20 min bei 37 °C inkubiert. Sofort im Anschluss erfolgt die Hitzeinaktivierung im vorgeheizten Heizblock bei 70 °C. Nach anschließendem Aufreinigen via Ethanolpräzipitation (Kap. 3.3.10) können die einzelnen shRNA-Oligonukleotide in *pF6gW* entsprechend dem Protokoll in Kap. 3.3.7 kloniert werden.

3.3.10 Ethanolpräzipitation

Dieses auch als Ethanolfällung bezeichnete Verfahren wird angewandt um DNA von bestimmten Stoffen zu trennen, die sich nach vorangegangenen Reaktionen, wie etwa Ligationen oder Restriktionsverdauen, in der Probe befinden.

Zum Gesamtvolumen der aufzureinigenden Probe (V_{gesamt}) wurde 3 M Natriumacetat (pH 5,2 - 5,4) mit einem Volumen von $\frac{V_{gesamt}}{10}$ und Ethanol absolut mit einem Volumen von $2,5 \cdot V_{gesamt}$ gegeben. Nach einer einminütigen Inkubationszeit folgte eine 15 minütige Zentrifugation mit 13000 rpm. Der Überstand wurde verworfen und 250 μL 70 %-igen Ethanols hinzupipettiert. Es folgte eine Inkubationszeit von 5 min. Anschließend wurde das Reaktionsgefäß 10 min zentrifugiert und danach das Ethanol aus dem Reaktionsgefäß pipettiert, sodass nur das Pellet am Boden verbleibt. Das Reaktionsgefäß wurde nun mit offenem Deckel für 15 min so lange aufrecht stehend in einem Ständer aufbewahrt, bis das gesamte Ethanol verdampft war. Anschließend wurden 20 – 40 μL dH₂O hinzugegeben und der gesamte Inhalt gevortext, bis sich das Pellet vollständig in dH₂O gelöst hatte.

3.3.11 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten

Um bei Ligrationsreaktionen eine Religation von DNA-Fragmenten zu verhindern, wurde das Enzym *CIAP* (*calf intestine alkaline phosphatase*) verwendet, welches freie 5'-Enden an DNA-Strängen dephosphoryliert.

Nach dem Restriktionsverdau wurden folgende Mengen in einem Reaktionsansatz verwendet:

10 – 40 μL	DNA nach Restriktionsverdau
5 μL	10x Reaktionspuffer
1 μL	CIAP (20 u)
ad 49 μL	dH ₂ O

Dieser Ansatz wurde bei 37 °C für 30 min inkubiert und danach für 15 min bei 75 °C inaktiviert.

3.3.12 Plasmidisolierung aus *E. coli*-Bakterien

Zur Isolierung von Plasmid-DNA, nach vorhergehender Transformation in *E. coli*-Bakterien, wurden Extraktion-Kits der Firma *Qiagen* verwendet. In Abhängigkeit davon, welche Menge an Plasmid-DNA isoliert werden sollte, wurden sogenannte *Mini-*, für kleinere, oder *Maxi-Preps*, für größere DNA-Mengen, durchgeführt. Basierend auf dem Prinzip der alkalischen Lyse [207] werden zu den Bakterien Natriumdodecylsulfat (*SDS*) und Natronlauge (*NaOH*) gegeben. Daraus resultiert die Denaturierung sowohl von Plasmid-DNA als auch der genomischen DNA. Nach Zugabe von *Natriumacetat* fallen Protein-SDS-Komplexe und chromosomale DNA, nicht aber Plasmid-DNA aus. Die Plasmid-DNA kann nun von chromosomaler DNA und den ausgefallenen Proteinen separiert und aufgereinigt werden.

3.3.13 Mini-Präparation von Plasmid-DNA (*QIAprep® Spin Miniprep-Kit*)

Zunächst wurden 5 mL LB-Medium in ein Reagenzglas überführt und mit einer Bakterienkolonie angeimpft. Das Reagenzglas wurde ÜN bei 37 °C in einem Schüttler inkubiert. Am folgenden Tag wurde der Inhalt in 15 mL Falcon-Röhrchen überführt und 15 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Anschließend wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 250 μL P1-Puffer resuspendiert und in Reaktionsgefäße überführt. Es folgte nun die Zugabe von 250 μL des P2-Puffers. Die Probe wurde dann mehrmals invertiert und danach für 5 min inkubiert. Anschließend wurden 350 μL N3-Puffer zur Probe hinzupipettiert und der Ansatz mehrmalig invertiert. Das Reaktionsgefäß wurde nun bei 13000 rpm für 15 min

bei RT zentrifugiert und der Überstand auf eine Säule aufgetragen. Die Säule wurde auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und für 30 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Hieran schloss sich ein Waschschrift an (Zentrifugation bei 13000 rpm für 30 sec mit 750 µL PE-Puffer). Der sich hier bildende Überstand wurde verworfen und die Säule nochmals für 30 sec mit 13 000 rpm zentrifugiert. Die Säule wurde anschließend auf ein neues Reaktionsgefäß gesteckt und mit 50 µL Elutionspuffer beladen. Nach einer Inkubationszeit von 1 min wurde die Säule wieder für 30 sec bei 13000 rpm zentrifugiert. Anschließend befand sich die aus der Säule gelöste DNA im Reaktionsgefäß und ihre DNA-Konzentration konnte photometrisch bestimmt werden (Kap. 3.3.1).

3.3.14 Maxi-Präparation von Plasmid-DNA (*Plasmid Maxi Kit*)

In einer Vorkultur wurden 5 mL LB-Medium mit einer Bakterienkolonie angeimpft und für ca. 6 h bei 37 °C und 200 rpm in einem Bakterienrührer inkubiert. 1 mL dieser Vorkultur wurden nun in 100 mL mit Antibiotika (abhängig vom eingesetzten Plasmid) versetztem LB-Medium pipettiert und ÜN bei 37 °C im Bakterienrührer inkubiert. Diese Bakteriensuspension wurde auf zwei 50 mL-Falcons aufgeteilt und bei 4000 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand wurde mit einer Pipette abgesogen und das Bakterienpellet in 10 mL P1-Puffer resuspendiert. Im Anschluss wurden 10 mL des P2-Puffers hinzugegeben, die Suspension mehrmals invertiert und insgesamt über 5 min inkubiert. Es folgte die Zugabe von 10 mL P3-Puffer und das Invertieren der Flüssigkeit. Der Ansatz wurde nun für 20 min auf Eis gestellt und danach für weitere 25 min bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert.

Anschließend wurde die Suspension durch Mullbinden gefiltert und auf Qiagen-Säulen, die vorher durch 10 mL QBT-Puffer equilibriert wurden, aufgetragen. Nachdem die Flüssigkeit durch die Säule geflossen war, wurde sie zweimalig mit 30 mL QC-Puffer gewaschen. Im Anschluss wurden 15 mL GF-Puffer auf die Säule aufgetragen und das Eluat in einem 50 mL-Falcon gesammelt.

In dieses Falcon wurden dann 10,5 mL Isopropanol pipettiert und der Ansatz für 1 h mit 4000 rpm bei 4 °C zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert, sodass nur das DNA-Pellet am Falconboden verblieb. Es wurden 5 mL

70%-igen Ethanol zugegeben und das Falcon erneut für 1 h bei 4000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das DNA-Pellet wurde nun über ca. 20 min luftgetrocknet und anschließend in 250 µL Elutionspuffer gelöst. Die Konzentrationsbestimmung an im Reaktionsgefäß gelöster DNA wurde wiederum photometrisch bestimmt (Kap. 3.3.1).

3.3.15 Sequenzierung (*Big Dye® Cycle Sequencing Kit version 3.1*)

Die im Zuge der Dissertation angefertigten DNA-Sequenzierungen basieren auf der Kettenabbruchmethode n. *Sanger* [208]. Analog zur PCR durchläuft der zu untersuchende DNA-Strang mehrere Durchgänge von Denaturierung, Primerhybridisierung und Elongation in eben dieser Reihenfolge. Im Unterschied zur PCR werden hierbei keine dNTPs verwendet, sondern ddNTPs. Jede dieser Basen ist mit einem Fluoreszenzfarbstoff versehen. Ein Einbau eines ddNTPs geschieht zufällig an jeder beliebigen Position innerhalb des DNA-Stranges und führt zum Kettenabbruch. Anschließend kann der Farbstoff an der Base, die den Kettenabbruch provozierte, mittels Anregung durch einen Laserstrahl in entsprechender Wellenlänge durch sein Emissionsspektrum detektiert werden. Für die Sequenzierung wurde das *Big Dye® Cycle Sequencing Kit version 3.1* der Firma *Life Technologies* verwendet.

Zunächst wurden folgende Mengen in ein Reaktionsgefäß pipettiert:

- 2 µl Plasmid-DNA [50 ng/µL]
- 1 µl des jeweiligen Sequenzierungsprimers [5 pmol/µL]
- 1 µl 5x - BDH-Puffer
- 1 µl BDH

Zur Amplifikation der DNA-Stränge wurde folgendes Programm im Thermocycler 29 mal durchlaufen:

- 9 30 sec bei 96°C (Denaturierung)
- 9 15 sec bei 50°C (Annealing)
- 9 4 min bei 60°C (Elongation)

Anschließend wurden die Proben bei 4 °C bis zu ihrer Sequenzierung aufbewahrt. Die Sequenzierung wurde freundlicherweise von der Virusdiagnostikabteilung des VIM im *ABI PRISM® 310 Genetic Analyzer* durchgeführt.

3.4 Virologische Methoden

3.4.1 Virusvermehrung und -präparation

Alle in dieser Dissertation verwendeten Viren (Kap. 2.3) wurden anhand des folgenden Protokolls vermehrt sowie präpariert.

Zur Virusvermehrung wurden zunächst Vero-Zellen in einer 175 cm²-Zellkulturflasche ausgesät und serumhaltiges Medium hinzugegeben, sodass alle Zellen von Medium bedeckt waren. Sobald die Zellen eine Konfluenz von etwa 70 – 80% erreicht hatten wurde das serumhaltige Medium durch 5 mL serumfreies Medium ersetzt. Im Anschluss erfolgte die Infektion dieser Zellen mit einer MOI (*multiplicity of infection*) von 0,01, gefolgt von einer einstündigen Inkubationszeit im Brutschrank. Danach wurde das virushaltige Nährmedium abgesogen und durch 20 mL serumfreies Medium ersetzt.

In den folgenden Tagen wurden die Zellen mittels Lichtmikroskop beobachtet und das Einsetzen des „*maximalen zytopathischen Effekts*“ (= Zell-Monolayer, bestehend aus vielen großen Synzytien, die sich kurz vor der Ablösung vom Zellkulturflaschenboden befinden) abgewartet. Die weitere Kultivierung dieser Zellen erfolgte bei 3 °C über 2 – 4 Tage. Im Anschluss wurde das gesamte Medium von den Zellen gesogen und durch 4 mL serumfreies Medium ersetzt, sodass der Monolayer gerade noch von Medium bedeckt wurde. Diese Zellkulturflaschen wurden bei -80 °C ÜN eingefroren, am darauffolgenden Tag auf Eis aufgetaut und die am Flaschenboden verbliebenen Zellen mittels Zellschaber gelöst. Falls mehrere Flaschen zur Viruszucht verwendet wurden, wurde der Inhalt der Flaschen nun an diesem Punkt vereint. Die Suspension aus Zellen wurde mehrmals auf- und abpipettiert. Um die Rate der in der Suspension befindlichen Viren noch zu erhöhen, wurde die Zellsuspension anschließend mit einem *Homogenisator* behandelt. Der Zelldebris wurde nun 15 min mit 4000 rpm bei 4 °C

abzentrifugiert. Der virenhaltige Überstand wurde in Kryotubes aliquottiert und bis zu deren Verwendung bei -80 °C kryokonserviert.

Als Negativkontrolle diente die sogenannte „Mockpräparation“, bei der die Zellen wie oben beschrieben behandelt werden, jedoch keine Infektion mit einem Masernvirus durchgeführt wurde.

3.4.2 Infektion von adhärennten Zellen

Adhärennt wachsende Zellen wurden in entsprechenden Zellkulturbehältnissen ausgesät und eine dementsprechend ausreichende Menge an Medium zugegeben. Nach einem Mediumwechsel am folgenden Tag, wurden die zur Infektion verwendeten Virusstämme in einem 37 °C warmen Wasserbad aufgetaut, anschließend mit einer MOI zwischen 0,01 und 0,1 auf die adhärennten Zellen pipettiert und bei 37 °C im Brutschrank weiterkultiviert. Nach 2 h wurde der Überstand von den Zellen abgezogen und durch frisches Medium ersetzt. Je nach verwendetem Virusstamm wurden die Zellen nach 24 – 48 h bezüglich einer Infektion durch die Bildung von Synzytien mittels Lichtmikroskop untersucht.

3.4.3 Herstellung lentiviraler Partikel

Zunächst wurden $2,5 \times 10^6$ 293T-Zellen auf im Durchmesser 10 cm messende Zellkulturschalen ausgesät und mit 10 mL Zellkulturmedium überlagert. Diese wurden anschließend ÜN im Brutschrank inkubiert. Bei einer mittels Lichtmikroskop ermittelten Zelldichte von ca. 80 % erfolgte die Transfektion analog zum Calcium-Phosphat-Transfektionsprotokoll (Kap. 3.1.4.2).

Dabei wurden folgende DNA-Mengen eingesetzt:

- 20 µg des jeweiligen lentiviralen Vektors
- 15 µg Hüllplasmide (10 µg des Vektors *pMDLg/pRRE* und 5 µg des Vektors *pRSV-Rev*)
- 6 µg des Vektors *pMD2G*

Nach 48 h Inkubationszeit im Brutschrank wurde das gesamte Medium von den Zellkulturschalen abgesogen und bei RT 5 min bei 3000 rpm zentrifugiert um im Medium befindliche Zellen zu separieren. Der partikelhaltige Überstand wurde

nun in Kryotubes aliquottiert und bis zu ihrer Weiterverwendung bei -80 °C tiefgefroren. In einem weiteren Schritt wurde der gewonnene Überstand ultrazentrifugiert, um die Konzentration der darin befindlichen Partikel zu erhöhen (s. Kap. 3.3.4).

3.4.4 Ultrazentrifugation der lentiviralen Partikel (*Amicon® Ultra-15*)

Eine Menge von bis zu 15 mL der gewonnenen lentiviralen Partikel (s. Kap. 3.3.3) wurde in die Filtereinheit des Ultrazentrifugengefäßes pipettiert. Anschließend wurde es mit 4000 x g für 45 min zentrifugiert. Das gewonnene Konzentrat befand sich nun am Boden der Filtereinheit. Es wurde mittels Pipette auf Kryotubes aliquottiert und bei -80 °C bis zur weiteren Verwendung kryokonserviert.

3.4.5 Transduktion der lentiviralen Partikel

Für Transduktionen wurden HeLa- und piNT2-Zellen in entsprechenden Zellkulturbehältnissen ausgesät und eine dementsprechend ausreichende Menge an Medium zugegeben. Die Zellen wurden im weiteren Verlauf lichtmikroskopisch auf den Grad ihrer Konfluenz hin untersucht. Sobald der gebildete Monolayer eine Konsistenz von mindestens 70 % erreicht hatte, wurde das Medium gewechselt und die gewünschte Menge (abhängig von der gewünschten *MOI*) an lentiviralen Partikeln auf das Medium pipettiert und kurz invertiert. Anschließend erfolgte eine ÜN-Inkubation im Brutschrank. Am folgenden Tag wurde das gesamte sich auf den Zellen befindende Medium abgenommen und durch 500 µL frisches Medium ersetzt.

3.4.6 Inhibition der Fusion von MV infizierten NT2-Zellen

Um die Synzytienbildung im Zuge der Versuche mit piNT2-Zellen zu unterbinden wurde das *Fusion Inhibiting Peptide (FIP; Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH)* verwendet.

Dazu wurden 50 mL DMEM 10% in 50 mL-Falcons gefüllt und *FIP* (300 µg/mL) hinzupipettiert. Dieses mit *FIP* versetzte Medium wurde in ein auf 37 °C temperiertes Wasserbad gestellt bis sich *FIP* vollständig gelöst hatte und eine homogene Flüssigkeit entstanden war. Dieses Medium wurde zur weiteren Verwendung bei 4 °C aufbewahrt. Bei Versuchen, in denen die Zell-Zell-Fusion inhibiert werden sollte, wurde es anstelle des üblichen Mediums verwendet.

3.4.7 Virustiterbestimmung mittels Plaquetest

Virustiter von Viruspräparationen wurden durch Plaque-Tests bestimmt. Das Ergebnis dieses Tests wird in „*plaque forming units*“ (*pfu/mL*) angegeben. In der vorliegenden Arbeit wurden sämtliche Virustiterbestimmungen mittels Plaquetest auf adhärennten Vero-Zellen durchgeführt.

2×10^5 Vero-Zellen wurden auf 6-well Zellkulturplatten ausgesät und ÜN im Brutschrank inkubiert. Um fortzufahren sollte sich am nächsten Tag in jedem der wells ein etwa 70 – 80 %iger Monolayer gebildet haben. Die zu bestimmende Virusstammlösung wurde auf Eis in 1:10 Verdünnungsschritten beginnend von 10^{-1} bis 10^{-10} in serumfreiem Medium angesetzt. Von den zu infizierenden Zellen wurde das gesamte Medium mittels Pipette entfernt und 1 mL des virushaltigen Mediums auf die in den Zellkulturplatten befindlichen Zellen pipettiert. Nach einer 60-minütigen Inkubationszeit im Brutschrank wurde das virushaltige Medium von den Zellen wieder abpipettiert und die Zellen zweimal mit serumfreiem Nährmedium gewaschen. Diese wurden anschließend mit in der Zwischenzeit hergestelltem, auf 40 °C warmen, Overlay-Agar überschichtet. Nach dem vollständigen Erstarren des Agars wurden die Zellkulturplatten für 5 Tage im Brutschrank inkubiert. Während dieser Zeit sollte sich ein deutlicher zytopathischer Effekt in Form von Synzytienbildungen innerhalb des Monolayers einstellen. Es folgte die Färbung der Overlaysschicht mit einer in PBS 1:100 verdünnten Neutralrotlösung 1,6 % (w/v) für 60 Minuten bei RT. Die Neutralrotlösung wurde anschließend abpipettiert und die Zellkulturplatten auf Zellstofftüchern abgeklopft, um sie von der restlichen Färbelösung zu befreien. Es folgte eine weitere 24-stündige Inkubation im Brutschrank. Beim anschließenden Betrachten der wells ergab sich nun ein Bild von voneinander abgegrenzten helleren sowie dunkleren Arealen. Die hellen, eher runden Areale sind durch Zell-Zell-Fusion gebildete Synzytien. Vitale Zellen sind in der Lage den Farbstoff Neutralrot aufzunehmen, dagegen ist die Fähigkeit der Aufnahme der Farbstofflösung durch die gebildeten Synzytien weitaus geringer ausgeprägt. Somit lässt sich beurteilen bis zu welcher Verdünnungsstufe eine Infektion, sichtbar an den helleren Arealen, noch möglich ist. Die Verdünnungsstufen, bei der die letzten hellen Plaques sichtbar sind, bestimmen den Virustiter. Die Anzahl der Plaques in

diesen wells stellt den reziproken Wert der infektiösen Partikeln pro mL in der Virusstammlösung dar.

3.4.8 Virustiterbestimmung mittels Endpunkttitration

Die Bestimmung des Virustiters mittels Endpunkttitration wurde im Zuge der Generierung lentiviraler Partikel durchgeführt. Alle in der vorliegenden Arbeit verwendeten lentiviralen Partikel exprimieren das Fluoreszenzprotein *eGFP*. Somit ist eine Titerbestimmung via Fluoreszenzmikroskop nach vorhergehender Transduktion möglich.

Hierzu wurden HeLa-Zellen herangezogen, die pro well mit einer Menge von 1×10^4 in 6-well-Platten ausgesät wurden. Diese wurden mit serumhaltigem Medium überlagert und ÜN im Brutschrank inkubiert. Sofern sich am folgenden Tag ein ausreichender Zellmonolayer von mindestens 80 % gebildet hatte, wurden die Zellen in 3 voneinander getrennten Ansätzen mit einer auf Eis angesetzten Verdünnungsreihe an lentiviralen Partikel in serumfreien Medium (beginnend von 1×10^{-1} bis 1×10^{-10}) beimpft. Je Verdünnungsstufe wurde 1 mL der Verdünnungsreihe auf das well überführt, nachdem das Zellkulturmedium zuvor abgesogen wurde. Anschließend folgte eine 24-stündige Inkubationszeit, wonach das viruspartikelhaltige Medium von den Zellen entfernt und durch 2 mL serumhaltiges Medium ersetzt wurde. Nach einer weiteren Inkubationszeit von 7 Tagen wurde aus den drei Ansätzen die Verdünnungsstufe als Virustiter festgelegt, bei der sich noch ausreichend grün fluoreszierende Zellen bei der Betrachtung mittels Fluoreszenzmikroskop zeigten. Die Titerangabe erfolgte in pfu/mL .

3.4.9 Herstellung persistierend infizierter NT2-Zellen

Im Zuge dieser Dissertation wurden NT2-Zellen mit dem Masernvirus *MV^{Edtag}CAMHeHCR_{red}* infiziert. Ziel war es, mittels der im Folgenden beschriebenen Zellkulturtechniken, eine persistierend infizierte Zelllinie zu erzeugen.

Zunächst wurden $1,5 \times 10^5$ NT2-Zellen in 6 x 25 cm²-Zellkulturflaschen ausgesät und 5 mL serumhaltiges Medium hinzupipettiert. Sobald die Zellen in den Zellkulturflaschen zu mindestens 80 % konfluent waren, wurde jede Flasche mit *MV^{Edtag}CAMHeHCR_{red}* mit einer unterschiedlichen *MOI* (0,01; 0,1; 0,2; 0,3; 0,4; 0,5)

infiziert. An jedem dritten Tag wurde ein Wechsel des Zellkulturmediums durchgeführt und mittels Fluoreszenzmikroskop evaluiert, in welcher der Zellkulturflaschen bereits eine ausreichende Menge an infizierten Zellen vorlag. Nach ca. 7 Tagen führte die Virusinfektion in den meisten der Zellkulturen zu einer großflächigen Zerstörung des Monolayers und dem damit verbundenen Zelltod vieler NT2-Zellen. Der im 3-Tages-Intervall durchgeführte Mediumwechsel wurde beibehalten. Zellkulturflaschen, in denen nicht genügend Zellen infiziert worden waren, wurden verworfen. In den übrigen Flaschen konnte man nach insgesamt 4 – 5 Wochen erste Zellen beobachten, die eine Rotfluoreszenz aufwiesen, jedoch mit den umliegenden Zellen keine Synzytien bildeten. Nach weiteren 2 Wochen wurde begonnen, die Zellen alle 4 – 5 Tage mit ATV abzulösen und im Verhältnis 1:2 zu splitten. Nach weiteren 3 – 4 Wochen zeigte das fluoreszenzmikroskopische Bild einen weitgehend homogenen Zellrasen aus rot fluoreszierenden Zellen mit lediglich vereinzelter Synzytienbildung. An diesem Punkt angelangt, wurden alle Zellen einer 25 cm²-Zellkulturflasche mit ATV abgelöst und in eine 75-cm²-Flasche überführt. Sobald die Zellen in diesen Zellkulturflaschen einen Monolayer ausgebildet hatten, wurden sie mittels ATV abgelöst und ein Teil der Zellen mit Sekundär- und Primärantikörpern (*MAb F227* und *Alexa488*) gemäß Protokoll in Kap. 3.2.1 gefärbt. Anschließend wurden die mit Antikörpern behandelten Zellen einer durchflusszytometrischen Analyse zugeführt-Analyse durchgeführt, um zu bestimmen wieviele dieser Zellen prozentual eine Infektion aufwiesen. Fortan wurden die Zellen zur weiteren Verwendung im Verhältnis 1:5 gesplittet.

4 Ergebnisse

4.1 Entwicklung, Herstellung und Etablierung eines *RNAi*-Indikatorsystems

Bevor einzelne *shRNA*-Konstrukte auf ihre Inhibition der viralen Replikation getestet wurden, sollte zunächst innerhalb eines plasmidbasierenden in vitro-Testsystems überprüft werden, in welchem Ausmaß die Expression einzelner Gene des MV inhibiert werden kann. Innerhalb dieses Systems wurden in der vorliegenden Arbeit die *MV-Proteine L, M, N* und *P* auf einen möglichen Genknockdown untersucht. Das vorrangige Ziel bestand darin, die Inhibition einer *RNAi*-induzierten Genexpression zu quantifizieren.

Das hier entwickelte Testsystem basiert auf zwei verschiedenen Plasmiden, die auch jeweils ein unterschiedliches Fluoreszenzprotein exprimieren (*Dual-Colour-System*). Verwendet wurden zum Einen ein lentiviraler Vektor, der *eGFP* als Transfektionsindikator exprimiert und darüber hinaus die genetische Information einer *shRNA* in einer zusätzlichen Expressionskassette trägt. Eine aus diesem Vektor transkribierte *shRNA* ist gegen eine der mRNAs der zu untersuchenden Masernvirusproteine gerichtet.

Mit den wirkungsvollsten *shRNA*-Sequenzen soll in sich anschließenden Experimenten untersucht werden, inwieweit durch sie persistierende (neuronale) MV-Infektionen inhibiert werden können. Postmitotische Neuronen zeigen in der Regel ein resistentes Verhalten gegenüber einer Übertragung genetischen Materials. Lentivirale Vektoren verfügen jedoch über die Fähigkeit einer Übertragung bzw. Transduktion genetischen Fremdmaterials auf diesen Zelltyp [209] und stellen daher ein potentiell Therapeutikum zur Behandlung infizierten Hirngewebes dar.

In einen zweiten Expressionsvektor wurde je eines der zu untersuchenden Maserngene kloniert. Zusätzlich exprimiert dieser Vektor das Fluoreszenzprotein *DsRed2*. In der Expressionskassette des Plasmids sind die beiden Gene so angeordnet, dass im Zuge der Transkription ein mRNA-Strang entsteht, der in 5'-3'-Richtung *DsRed2* und anschließend eines der klonierten Maserngene trägt.

Beide sind voneinander durch ein *STOP-Codon* getrennt. Eine nähere Charakterisierung beider Vektoren ist in den Kapiteln 4.1.1 bis 4.1.2.1 beschrieben.

Werden nun beide Plasmide, das Indikatorplasmid und lentiviraler Vektor, in Zellen transfiziert, wird die zusammenhängende mRNA des Indikatorplasmids, bestehend aus der genetischen Information von *DsRed2* und des jeweiligen MV-Proteins, transkribiert. An den Ribosomen erfolgt die Translation dieses mRNA-Stranges bis zu dem *STOP-Codon* zwischen *DsRed2* und dem inklonierten Maserngen. Dies führt zur Expression von *DsRed2* und damit Fluoreszenz der transfizierten Zellen bei deren Betrachtung unter entsprechend emittierter Wellenlänge.

Die Transfektion der lentiviralen Vektoren führt neben *eGFP* als Transfektionsindikator ebenfalls zur Expression einer bestimmten *shRNA*, die anschließend durch das Enzym *Dicer* in die für den Knockdown verantwortliche *siRNA* umgewandelt werden kann. An *RISC* gebunden, können diese gegen MV-Gene gerichteten RNA-Konstrukte an die vom Indikatorplasmid transkribierte mRNA im Bereich hinter *DsRed2* und *STOP-Codon* binden, was zu einer Spaltung des gesamten mRNA-Stranges und dessen darauffolgender Degradation führt. Eine verminderte Expression von *DsRed2* und eine Abnahme der Rotfluoreszenz ist die Folge. Dieser Effekt kann in den transfizierten Zellen ebenfalls mittels Fluoreszenzmikroskopie beobachtet, Durchflusszytometrie quantifiziert und mit einer entsprechenden Kontroll-*shRNA* verglichen werden.

Die Vorgänge innerhalb des *RNAi*-Indikatorsystems sind in Abb. 4.1 schematisch dargestellt.

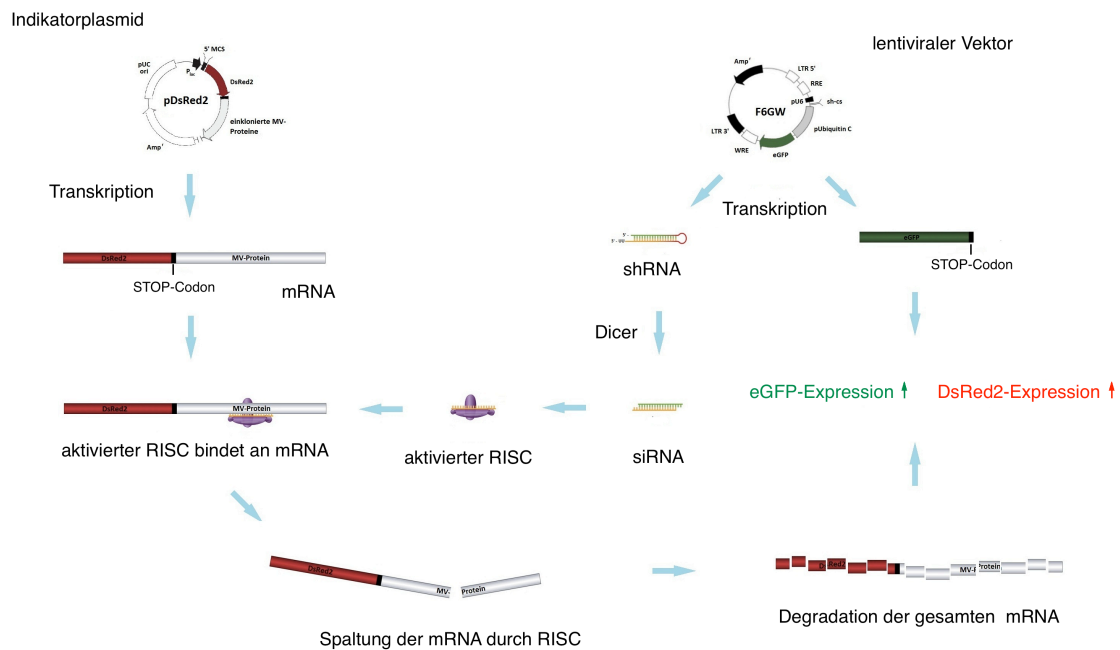


Abb. 4.1 | Schema des RNAi-Indikatorsystems

4.1.1 Herstellung von shRNA-exprimierenden Vektoren

Für die Expression von shRNAs wurde der lentivirale Vektor *pF6GW* (*Flap*, *U6*, *GFP*, *woodchuck posttranscriptional enhancer element*) verwendet. Basierend auf dem Plasmid *pFUGW* [210] ist eine U6-Promotersequenz an der Schnittstelle *PacI*, am 5'-Ende des Ubiquitinpromoters enthalten. Somit kann zum Einen die shRNA-Sequenz über den *U6-Promoter* und über den sich anschließenden *Ubiquitinpromoter* eGFP als Transfektionindikator translatiert und exprimiert werden. (s. Abb. 4.2)

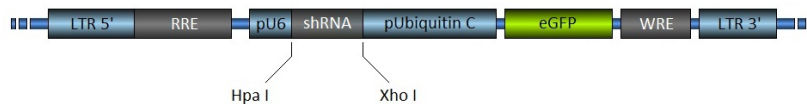


Abb. 4.2 | Schematischer Aufbau von *pF6GW*

LTR 5'/3' = Long terminal repeats am 5'/3'-Ende, *RRE* = rev responsive element, *pU6* = U6-Promotor, *shRNA* = einklonierte shRNA-Sequenz, *pUbiquitin C* = Ubiquitin-Promotor, *eGFP* = enhanced Green Fluorescent Protein, *WRE* = Wnt-responsive element

Um über einen gewissen Pool an shRNAs zu verfügen, wurden je drei shRNA-Sequenzen für jedes der vier MV-Gene ausgewählt. Um entsprechende Sequenzen herauszufiltern wurde die Software *iRNAi 2.0* (<http://mekentosj.com/irnai>) verwendet. Nach der Eingabe von MV-Genen, deren Expression durch *RNAi* inhibiert werden soll, bestimmt es unter Verwendung diverser Algorithmen, geeignete DNA-Konstrukte, die in Form von wahlweise *siRNAs* oder *shRNAs* in entsprechende Expressionsvektoren kloniert werden können. Als Kontrolle diente zusätzlich ein *shRNA*-Konstrukt, dessen Expression aufgrund nicht übereinstimmender Sequenzhomologien in Bezug auf die zu untersuchenden Gene des MV zu keiner Inhibition der Maserngenexpression führen sollte. Die von der Software ausgewählten Sequenzen wurden anschließend mittels DNA-Datenbanken überprüft, ob aufgrund etwaiger Sequenzhomologien Einfluss auf die Expression für den Zellstoffwechsel wichtiger Proteine bestehen könnte. Dies konnte für alle verwendeten Sequenzen ausgeschlossen werden.

Von jeder der ausgewählten Sequenzen wurden zwei zueinander komplementäre DNA-Oligonukleotide geordert (www.sigma.de). Sense- und anti-sense-Strang verfügten über je 18 bis 20 Basenpaare, die durch eine *Loop-Struktur* voneinander getrennt waren. Dabei war die *Loop-Struktur* identisch mit der zellulären humanen *miR30 pre-micro-RNA* (TGTGAAGCCACAGATGG), von der eine im Vergleich mit anderen Loop-Strukturen höhere Effizienz bezüglich des gene-silencings bekannt ist [211]. Die jeweiligen Sequenzen korrelieren mit den Nukleotiden innerhalb der einzelnen Gensegmente des Masernvirus wie folgt (beginnend mit 1 am entsprechenden Startcodon ATG):

L-Protein:

L4 (2544 - 2562), L6 (4864 - 4882), L7 (5280 - 5298)

M-Protein:

M1 (722 - 739), M3 (820 - 837), M4 (567 - 586)

N-Protein:

N1 (607 - 625), N2 (1035 - 1053), N3 (116 - 134)

P-Protein:

P1 (311 - 329), P2 (373 - 391), P6 (1005 - 1023)

Nach den inklonierten Maserngenen folgen am 3'-Ende jeweils sechs Thymidin-Basen um einen Transkriptionsstopp für die *zelluläre DNA-abhängige-RNA-Polymerase III* im Zuge der Translation herbeizuführen.

Eine Besonderheit bilden die Oligonukleotidinserts des Plasmids *pF6GW-M1* an der Stelle 19 innerhalb des Konstruktes. In 5'-3'-Richtung findet sich eine bezüglich des anti-sense-Stranges nicht komplementäre Base hinter der Loopstruktur. Das hier normalerweise anzutreffende Guanin wurde durch die Base Adenosin ersetzt. Ziel ist es diesbezüglich eine thermodynamische Asymmetrie zu generieren, bzw. die Duplex-Struktur der zueinander komplementären *shRNA*-Stränge zu destabilisieren. Dies begünstigt neben einer gesteigerten Selektion des die mRNA erkennenden anti-sense-Stranges, eine Degradation des sense-Stranges.

Eine Übersicht der verschiedenen *shRNA*-Sequenzen und deren Basenabfolge ist der folgenden Abb. 4.3 zu entnehmen.

	loop-Struktur			
	←-----→			
N1: 5' - TAGAAGGGTAGTTGGTAAATC	TGTGAAGCCACAGATGG		GATTCACCAACTACCCTTCTTTTTT	- 3'
N2: 5' - TCTCCATGGGAGGTTTGAACC	TGTGAAGCCACAGATGG		GGTTCAAACCTCCCATGGAGTTTTT	- 3'
N3: 5' - TTCCCTGGAGATTCCTCAAC	TGTGAAGCCACAGATGG		GTTGAGGAATCTCCAGGGATTTTTT	- 3'
P1: 5' - TGCACTGGGTACAGTGTTAC	TGTGAAGCCACAGATGG		GTAACACTGTAACCCAGTGCTTTTTT	- 3'
P2: 5' - TGATGCTGACTCTATCATGGC	TGTGAAGCCACAGATGG		GCCATGATAGAGTCAGCATCTTTTTT	- 3'
P6: 5' - TGCTAGAATCACTGCTATTAC	TGTGAAGCCACAGATGG		GTAACAGCAGTGATTCTAGCTTTTTT	- 3'
M1: 5' - TTCGAAAAGATGGGCCTGATC	TGTGAAGCCACAGATGG	GAC	CAGGCCCATCTTTTTCGATTTTTT	- 3'
M3: 5' - TCTCGGGTTCAAGAAGACC	TGTGAAGCCACAGATGG		GGTCTTCTTGAACCCGAGTTTTT	- 3'
M4: 5' - TCCTGCTGGTGACCCTTAGGAC	TGTGAAGCCACAGATGG		GTCCTAAGGGTCACCAGCAGGTTTTT	- 3'
L4: 5' - TGAGCATCGCAAGATGTGTAC	TGTGAAGCCACAGATGG		GTACACATCTTGCGATGCTTTTTT	- 3'
L6: 5' - TCCAGGGACCTGCCACCAAC	TGTGAAGCCACAGATGG		GTTGGTGGGCAGGTCCCTGGTTTTT	- 3'
L7: 5' - TTCGGGTTGAACTCATCTGCC	TGTGAAGCCACAGATGG		GGCAGATGAGTTCAACCCGATTTTTT	- 3'
Kontrolle: 5' - TCTCAACGGTCAACATATTAC	TGTGAAGCCACAGATGG		GTAATATGTTGACCGTTGAGTTTTT	- 3'

Abb. 4.3 | Schema der zur *siRNA*-Expression verwendeten DNA-Oligonukleotide

Grundstruktur bzw. Basenabfolge der einzelnen *shRNA*-Oligonukleotide. Innerhalb der *shRNA-M1* findet man zwei zueinander nicht komplementäre Basen, welche rot hervorgehoben sind.

pF6gW wurde durch die beiden Restriktionsenzyme *Hpa I* und *Xho I* enzymatisch verdaut, anschließend auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und via Gelelektrophorese aufgetrennt. War der Verdau erfolgreich, fand sich unter einer UV-Lichtquelle der Vektor im Vergleich zur unverdauten Kontrolle in linearisierter Form bei einer Länge von etwa 11 kb (Abb. 4.4). Die verdaute DNA wurde

anschließend aus dem Gel geschnitten und mit dem *QIAGEN DNA Extraction Kit* aufgereinigt (s. Kap. 3.3.3).

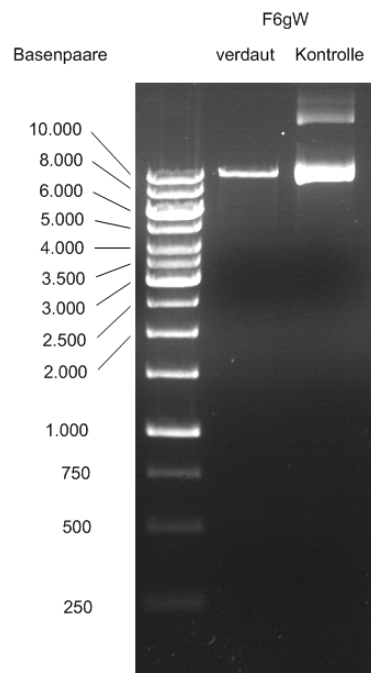


Abb. 4.4 | Aufnahme der Gelelektrophorese von *pF6gW* nach dem Verdau mit *HpaI* und *XhoI*

Die linke Bande entspricht dem mit *HpaI* und *XhoI* verdauten Vektor. Im Vergleich dazu ist eine unverdaute Kontrolle abgebildet.

Die zueinander komplementären DNA-Oligonukleotide wurden analog des Protokolls in Kapitel 3.3.9 zuerst annealed und anschließend phosphoryliert, um sie im folgenden Schritt in das bereits enzymatisch verdaute *F6gW*-Plasmid klonieren zu können. Um einer möglichen Religation des verdauten *pF6GW* entgegenzuwirken, wurden dessen Enden enzymatisch dephosphoriliert.

Es folgte die Klonierung der doppelsträngigen DNA-Oligonukleotide in die *multiple cloning site (mcs)* des Vektors. Nach deren Transfektion in *XL-10 Gold E. coli-Bakterien* wurden diese auf Agarplatten mit Ampicillinresistenz aufgetragen und ÜN bei 37 °C inkubiert. Aus den auf diese Weise selektierten Kolonien wurden anschließend Minipreps hergestellt. Um festzustellen, ob die Klonierungen der *shRNA*-Oligos erfolgreich, bzw. ob die einklonierten Sequenzen korrekt waren, wurde die aus den Minipreps gewonnene DNA sequenziert. Die hierfür

verwendeten Primer waren *F6gW-seq-fw*, für Sequenzierungen in 3'-Richtung und *F6gW-seq-rev* in 5'-Richtung.

In den Abbildungen 4.5 bis 4.9 werden die Sequenzierungen der hergestellten Klone aus DNA-Oligonukleotiden aufgeführt.

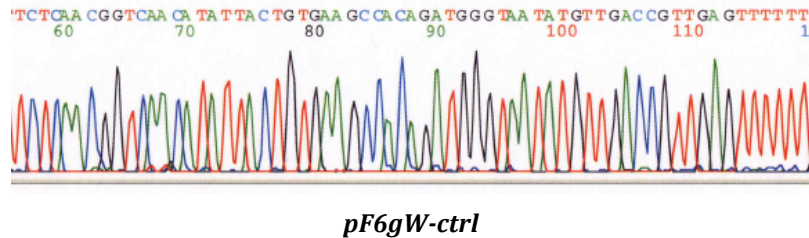


Abb. 4.5 | Sequenzierung von pF6gW-ctrl

Für die Sequenzierung wurde der Primer *F6gW-seq-fw* verwendet.

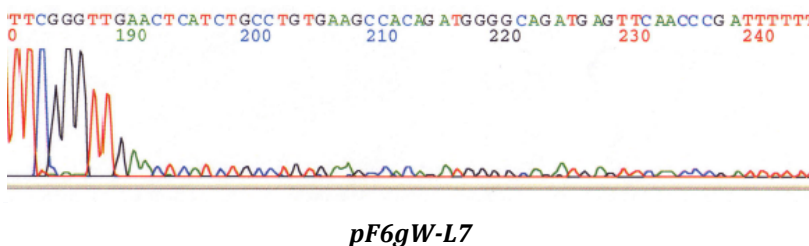
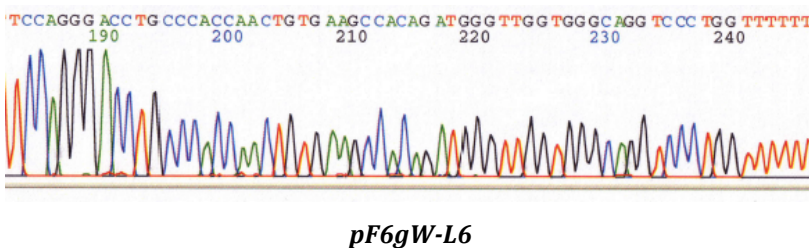
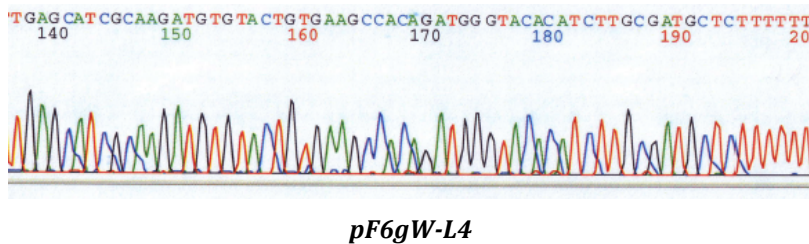
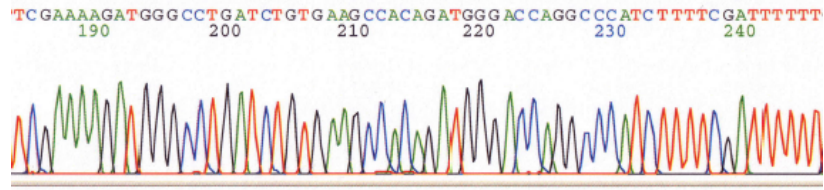
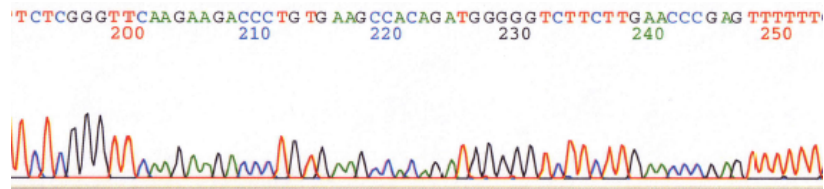


Abb. 4.6 | Sequenzierung von pF6gW-L4, -L6, -L7

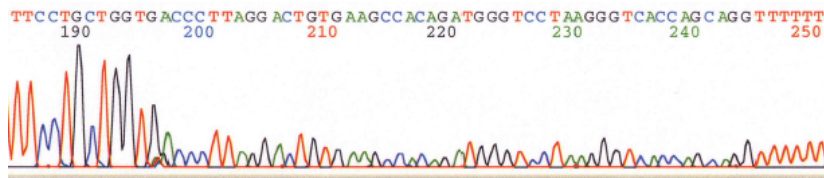
Für die Sequenzierung wurde der Primer *F6gW-seq-fw* verwendet.



pF6gW-M1



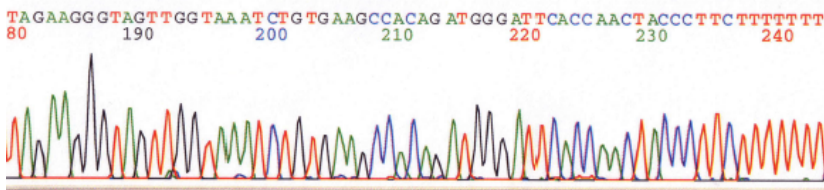
pF6gW-M3



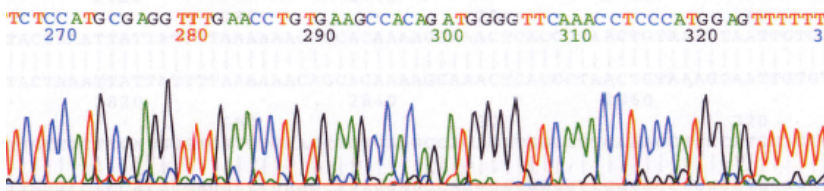
pF6gW-M4

Abb. 4.7 | Sequenzierung von pF6gW-M1, -M3, -M4

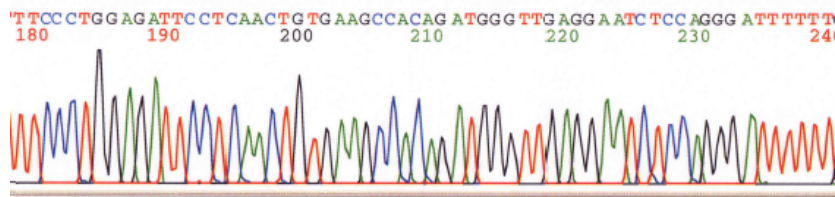
Für die Sequenzierung wurde der Primer *F6gW-seq-fw* verwendet.



pF6gW-N1



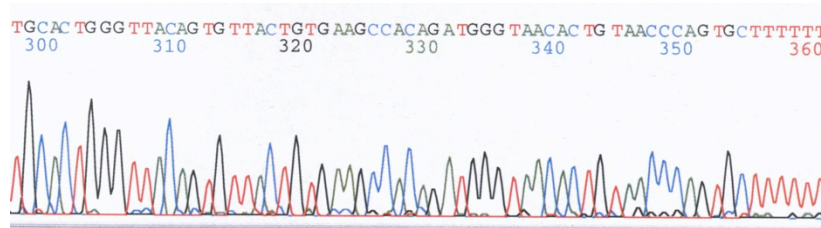
pF6gW-N2



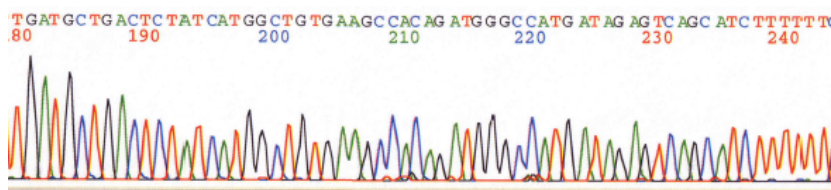
pF6gW-N3

Abb. 4.8 | Sequenzierung von *pF6gW-N1*, *-N2*, *-N3*

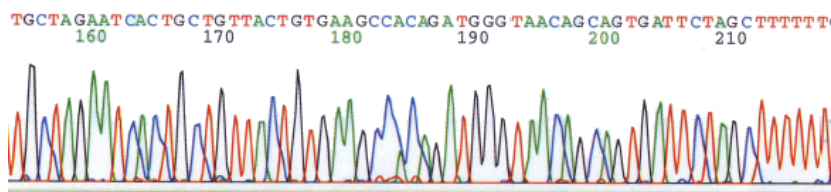
Für die Sequenzierung wurde der Primer *F6gW-seq-fw* verwendet.



pF6gW-P1



pF6gW-P2



pF6gW-P6

Abb. 4.9 | Sequenzierung von *pF6gW-N1*, *-N2*, *-N3*

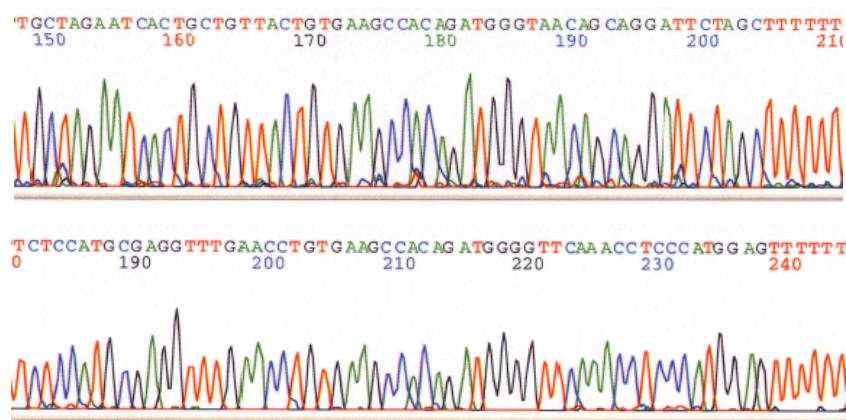
Für die Sequenzierung wurde der Primer *F6gW-seq-fw* verwendet.

Im Zuge der Klonierung der *shRNAs* *N2* und *P6* lieferte die anschließende Kontrollsequenzierung der Plasmide im Bereich der einklonierten *shRNA*-Sequenzen Unregelmäßigkeiten bezüglich der Basenabfolge im Bereich der

zueinander komplementären Abschnitte innerhalb der Loop-Struktur (s. Abb. 4.10a und 4.10b).

In den folgenden Versuchen wurden sie als zusätzliche Kontrolle verwendet um ihre Effekte auf einen möglichen Genknockdown in Vergleich zu den korrekt einklonierten Sequenzen zu untersuchen. In Anlehnung an die eigentlichen Inserts werden diese Plasmide fortan *pF6gW-P6a* und *-N2a* genannt.

Das Ergebnis der Sequenzierung in Abb. 4.10 dargestellt und Ihre Sequenz im Vergleich zu *pF6gW-P6* und *-N2* beschrieben.



N2:	5' -	TCTCCATGGGAGGTTTGAACC	TGTGAAGCCACAGATGG	GGTTCAAACCTCCCATGGAGTTTTTT	- 3'
N2a:	5' -	TCTCCATG <u>C</u> GAGGTTTGAACC	TGTGAAGCCACAGATGG	GGTTCAAACCTC <u>C</u> CATGGAGTTTTTT	- 3'
P6:	5' -	TGCTAGAATCACTGCTATTAC	TGTGAAGCCACAGATGG	GTAACAGCAGTGATTCTAGCTTTTTT	- 3'
P6a:	5' -	TGCTAGAATCACTGCTATTAC	TGTGAAGCCACAGATGG	GTAACAGCAG <u>X</u> GATTCTAGCTTTTTT	- 3'

Abb. 4.10 | Ermittelte Sequenz der *shRNAs* *N2a* und *P6a* und Vergleich mit *P6* und *N2*

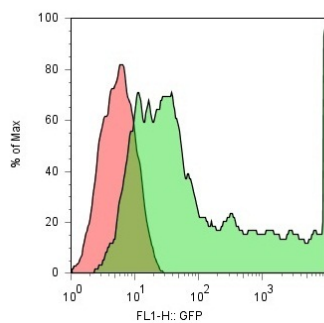
Im Falle von *N2a* befindet sich an Stelle 9 des einklonierten Oligonukleotids nicht die Base Guanin, sondern Cytosin. Somit sind die Basen an den Stellen 9 und 50 innerhalb der *shRNA*-Sequenz zueinander nicht komplementär. Bei *P6a* sollte sich eigentlich an Stelle 48 die Base Thymin befinden, welche jedoch im Zuge der Klonierung deletiert wurde.

4.1.1.1 Prüfung der generierten lentiviralen Vektoren auf ihre Expression

Werden die in Kap. 4.1.1 generierten lentiviralen Vektoren in Zellen transfiziert, sollte es zu einer Expression sowohl der einklonierten *shRNA*-Sequenzen über die *DNA-abhängige-RNA-Polymerase III* und *eGFP* über die *DNA-abhängige-RNA-Polymerase II* kommen. Somit kann durch den Nachweis von *eGFP* von einer Expression der *shRNA* ausgegangen werden.

Um die Expression von *eGFP* zu überprüfen, wurden zunächst 293T-Zellen in 6-well-Platten ausgesät und nach 24-stündiger Inkubationszeit mit 2 µg Plasmid-DNA mittels 5 µl des Transfektionsmediums *PEI* transfiziert. 48 h später folgte die Analyse der transfizierten Zellen mittels Durchflusszytometrie. In einem Histogramm wurde daraufhin ausgewertet, wie viele der gemessenen Zellen eine grüne Fluoreszenz aufwiesen. Als Negativkontrolle dienten lediglich mit *PEI* behandelte Zellen ohne Plasmid.

Das Ergebnis aller Transfektionen ist in den Abbildungen 4.11 bis 4.15 dargestellt.



pF6gW-ctrl

Abb. 4.11 | Expression von *eGFP* nach Transfektion von *pF6gW-ctrl* in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm

Negativkontrolle (rot) und Zellen, die mit *shRNA*-exprimierenden Plasmiden transfiziert wurden (grün)

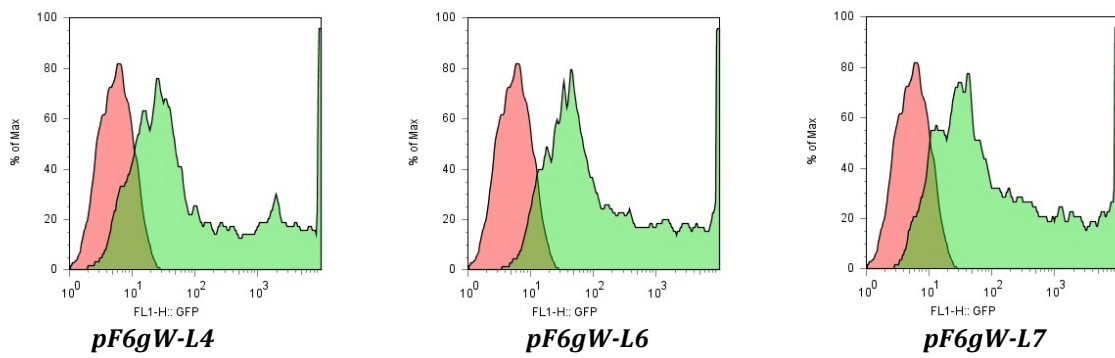


Abb. 4.12 | Expression von *eGFP* nach Transfektion von *pF6gW-L4*, *-L6* und *-L7* in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm

Negativkontrolle (rot) und Zellen, die mit *shRNA*-exprimierenden Plasmiden transfiziert wurden (grün).

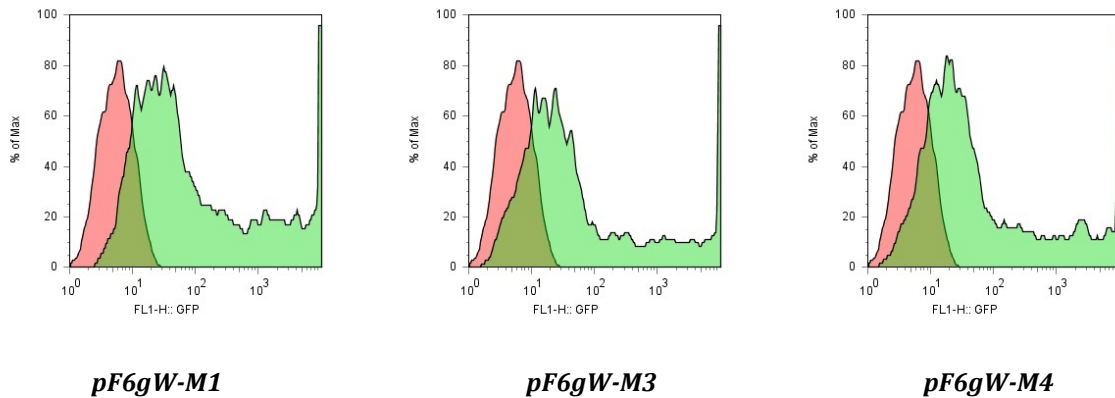


Abb. 4.13 | Expression von *eGFP* nach Transfektion von *pF6gW-M1*, *-M3* und *-M4* in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm

Negativkontrolle (rot) und Zellen, die mit *shRNA*-exprimierenden Plasmiden transfiziert wurden (grün).

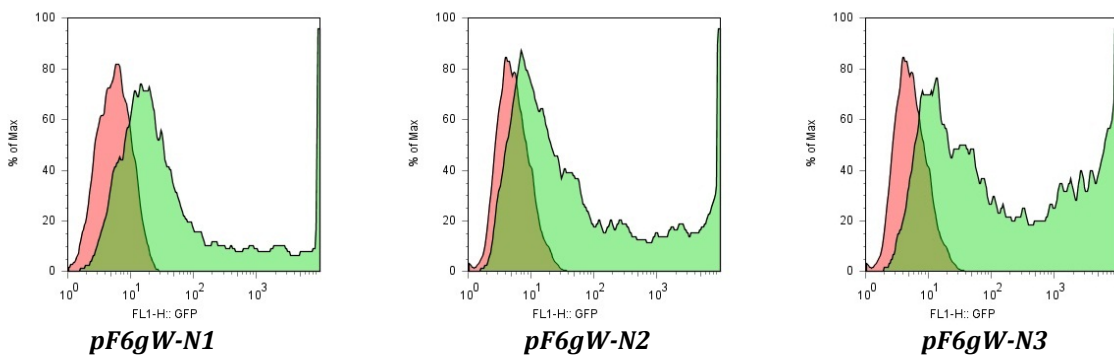


Abb. 4.14 | Expression von *eGFP* nach Transfektion von *pF6gW-N1*, *-N2* und *-N3* in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm

Negativkontrolle (rot) und Zellen, die mit *shRNA*-exprimierenden Plasmiden transfiziert wurden (grün).

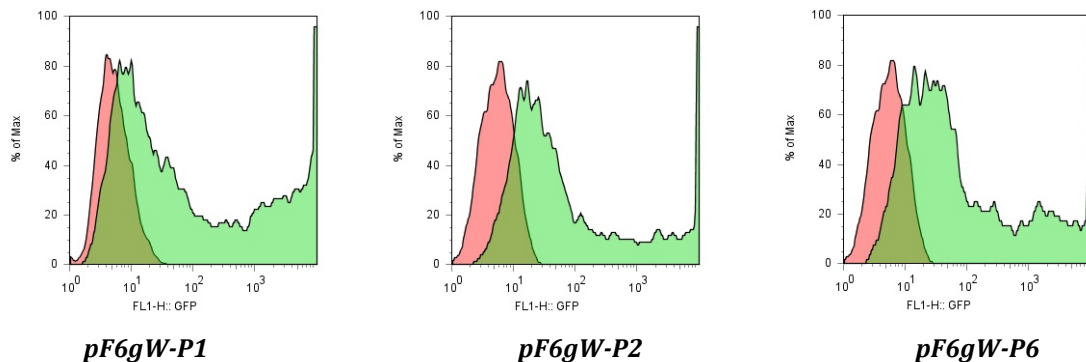


Abb. 4.15 | Expression von *eGFP* nach Transfektion von *pF6gW-P1*, *-P2* und *-P6* in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm

Negativkontrolle (rot) und Zellen, die mit *shRNA*-exprimierenden Plasmiden transfiziert wurden (grün).

Aus den Abbildungen 4.11 bis 4.15 ist zu entnehmen, dass jeder der generierten lentiviralen Vektoren nach dessen Transfektion in 293T-Zellen zu einer Expression von *eGFP* in den Zielzellen führt. Somit findet sowohl die Translation bzw. Expression von *eGFP* als auch die Expression der *shRNAs* in den transfizierten Zellen statt.

4.1.1.2 Prüfung der *shRNA*-exprimierenden Vektoren auf Zytotoxizität

Mit Hilfe des *MTT-Zytotoxizitätstests* (s. Kap. 3.1.6) wurde untersucht, ob bei Transfektionen der verwendeten lentiviralen Vektoren ein zytopathischer Effekt in den Zielzellen zu beobachten ist.

Hierzu wurden 293T-Zellen in 6-well Platten ausgesät und nach 24 h mit 2 μg Plasmid-DNA und 5 μl *PEI* transfiziert. 48 h post transfectionem erfolgte die Durchführung des *MTT*-Tests (s. Kap. 3.1.6). Als Kontrollen dienten einerseits untransfizierte 293T-Zellen (*Kontrolle 1*) und 293T-Zellen, die ausschließlich mit 2 μg *PEI* ohne die Zugabe von DNA behandelt wurden (*Kontrolle 2*). Abb. 4.16 stellt die Mittelwerte aller 12 wells dar, die im Verhältnis zur *Kontrolle 1* in Prozent umgerechnet wurden.

Das Ergebnis des Tests ist in Abb. 4.16 aufgezeigt.

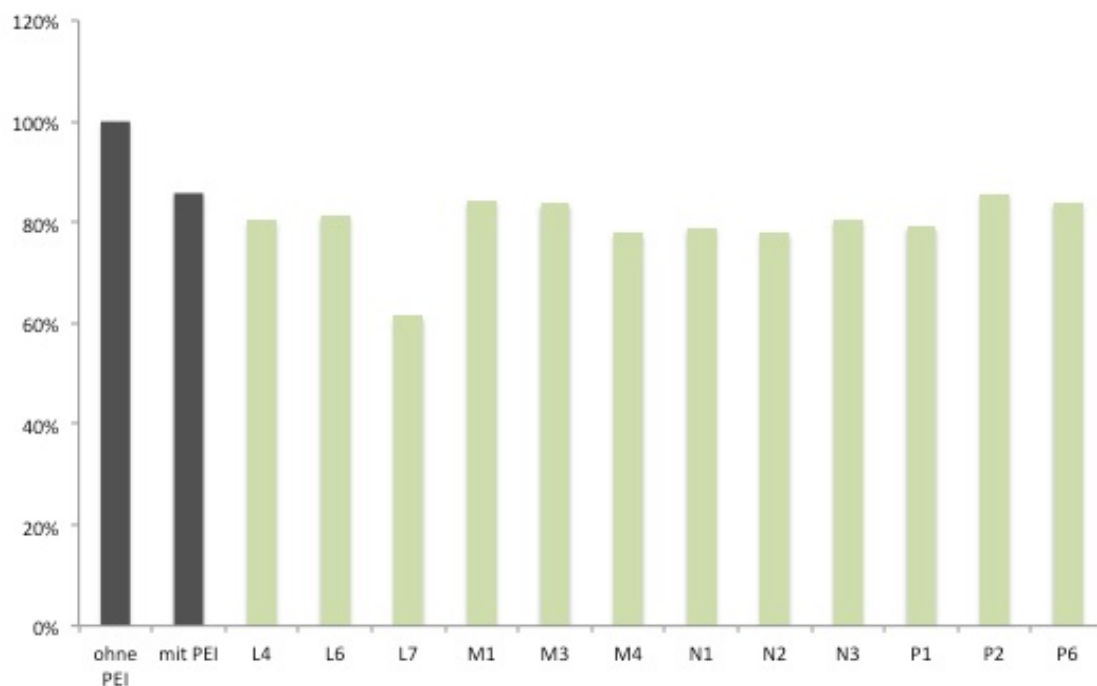


Abb. 4.16 | Übersicht der Ergebnisse des *MTT*-Zytotoxizitätstest

Die grauen Balken stellen die beiden Kontrollen dar (linker Balken: native 293T-Zellen (*Kontrolle 1*), rechter Balken: 293T-Zellen behandelt mit *PEI* ohne DNA (*Kontrolle 2*)). 293T-Zellen in welche die entsprechenden lentiviralen Vektoren transfiziert wurden sind durch die grünen Balken abgebildet (in der Reihenfolge von links nach rechts: *L4*, *L6*, *L7*, *M1*, *M3*, *M4*, *N1*, *N2*, *N3*, *P1*, *P2*, *P6*).

Aus Abb. 4.16 ist ersichtlich, dass die verwendeten *shRNA*-Sequenzen keinen zytopathischen Effekt in den untersuchten Zellen haben. Die alleinige Behandlung der Zielzellen mit dem Transfektionsmedium *PEI* zeigte bereits einen leichten Abfall der Zellvitalität auf ca. 86 - 89 % im Vergleich zu unbehandelten 293T-Zellen. Durch die Verwendung von *PEI* mit Plasmid-DNA und ihrer damit

verbundenen Transfektion konnte bei den verwendeten 293T-Zellen kein weiterer beträchtlicher Abfall in puncto Zellvitalität verzeichnet werden. Lediglich bei der Verwendung des Vektors *pF6GW-L7* kam es, verglichen mit den restlichen Plasmiden, zu einem größeren Abfall. So zeigte dessen Transfektion einen Rückgang der Zellvitalität auf 61 %.

4.1.2 Herstellung der Indikatorplasmide

4.1.2.1 Mutagenese von *pDsRed2-C1*

Laut Produktbeschreibung des Herstellers weist *pDsRed2-C1* im Bereich der ersten Nukleotide der *mcs* direkt hinter dem Gen des *DsRed2-Proteins* eine Restriktionsschnittstelle für das Enzym *Bgl II* auf (Abb. 4.17). Um die genaue Basenabfolge im Anfangsbereich der *mcs* sicherzustellen, wurde das Plasmid mit dem Primer *pDsRed2-seq fw*, der etwa 200 bp vor der *mcs* ansetzt, sequenziert (Abb. 4.17).

A



B

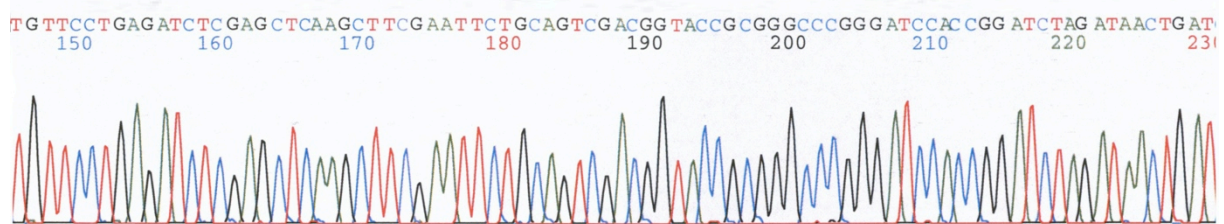


Abb. 4.17 | Sequenz *pDsRed2-C1* vor Mutagenese

A: Laut Produktbeschreibung, **B:** nach Sequenzierung

Das direkt dem *DsRed2*-Gen folgende Basentriplett AGA (bp 1288 – 1290) sollte durch gerichtete Mutagenese in das *STOP-Codon* TAA umgewandelt werden (Abb. 4.18). Für die Durchführung der Mutagenese wurden die beiden komplementären DNA-Oligonukleotide *DsRed2-stop forward* und *DsRed2-stop*

reverse, die bis auf diese drei Basen eine identisch Basenabfolge mit der DNA von *pDsRed-C1* haben, verwendet (s. Kap. 3.3.6).

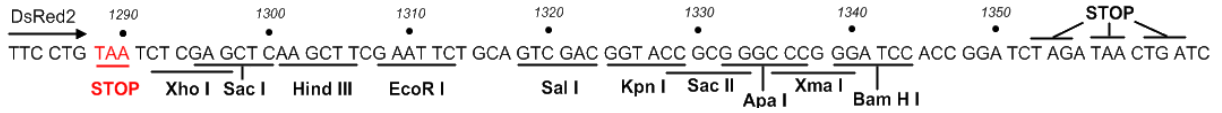


Abb. 4.18 | Sequenz *pDsRed2-C1* nach Mutagenese

Um den Erfolg der Mutagenese zu bestätigen wurde das neu generierte Plasmid unter Verwendung des Primers *pDsRed2-seq fw* sequenziert (Abb. 4.19).

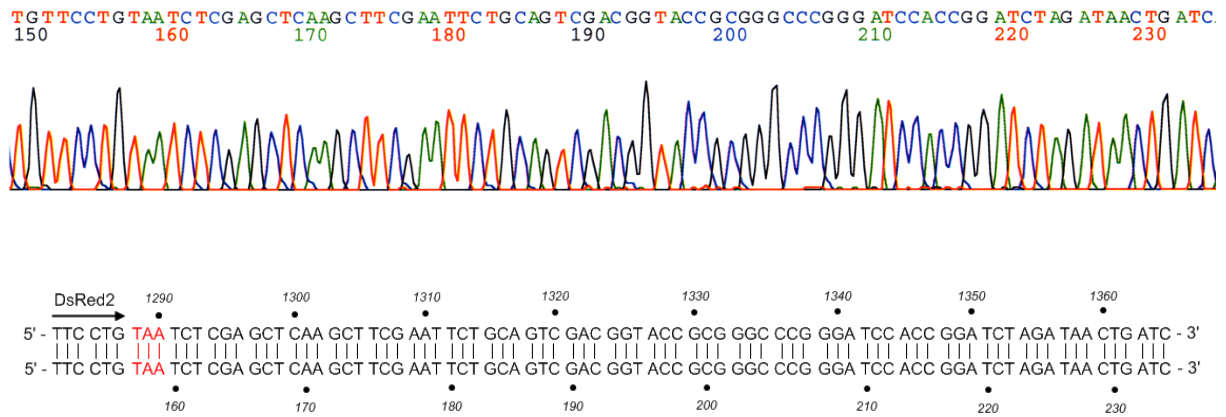


Abb. 4.19 | Durch Sequenzierung bestätigter Erfolg der Mutagenese im Bereich der *mcs*

Der rot markierte Bereich stellt die neue Sequenz des Plasmids nach erfolgter Mutagenese dar: Eine Veränderung des Basentriplets AGA zu TAA im Bereich 1288-1290.

Abb. 4.19 zeigt den Erfolg der gewünschten Mutagenese innerhalb von *pDsRed2-C1*. Nach der Bestätigung der erfolgreichen Mutagenese wurde das Plasmid fortan *pDsRed2-C1-stop* genannt.

4.1.2.2 Klonierung der Maserngene in *pDsRed2-C1-stop*

Nach erfolgter Mutagenese von *pDsRed2-C1* folgte die Klonierung der vier verschiedenen Maserngenen L, M, N und P in die *mcs* im Bereich hinter dem generierten *STOP-Codon*.

pDsRed2-C1-stop wurde zunächst durch *EcoR I* enzymatisch verdaut und anschließend mittels Agarosegelelektrophorese auf eine stattgehabte Linearisierung überprüft (Abb. 4.20). Anschließend wurde die verdauten Plasmid-DNA, wie bereits zuvor die verdauten lentiviralen Vektoren (Kap. 4.1.1), mittels des *Quiagen DNA Extraction Kit* aufgereinigt. Das DNA-Fragment wurde nun am 5'- und 3'-Ende enzymatisch dephosphoryliert.

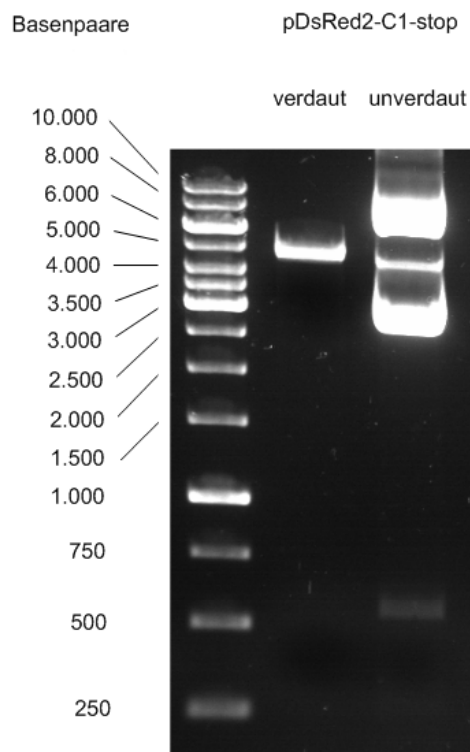


Abb. 4.20 | Gelelektrophorese des enzymatischen Verdaus von *pDsRed-C1-stop* mit *EcoRI*

Die einzelnen Maserngene lagen in Vektoren kloniert vor. Und konnten durch einen Verdau mit den in Tab. 4.1 aufgeführten Restriktionsenzymen aus ihnen extrahiert werden.

Vektor	Im Vektor enthaltenes Maserngen	Verwendete Restriktionsenzyme
pEMC-La	L	MfeI
pCG-MVedmM	M	MfeI
pSC-N	N	MfeI
pSC-P	P	Eco RI und SalI

Tab. 4.1 | Übersicht der Restriktionsenzyme, mit denen die DNA der MV-Gene L, M, N und P aus den verschiedenen Plasmiden gewonnen wurden

Nach dem durchgeführten Restriktionsverdau jedes einzelnen Plasmids wurden die verschiedenen Ansätze auf ein 1%iges Agarosegel aufgetragen und einer Gelelektrophorese unterzogen. Diese Fragmente wurden ebenfalls unter einer UV-Lichtquelle aus dem Gel geschnitten und mittels des *Quiaquick Gel Extraction Kits* aufgereinigt. Jedes einzelne der vier DNA-Fragmente konnte nun mit dem bereits präparierten Vektor *pDsRed2-C1-stop* ligiert werden. Die Ansätze wurden fortan als *pDsRed-C1-stop-L*, *-M*, *-N* und *-P* bezeichnet.

Als Kontrolle, ob die angestrebte Ligation der Inserts mit dem Vektor erfolgreich war, wurde für jeden der vier Ansätze eine PCR durchgeführt. Als Primer konnten diesbezüglich die Primer *pDsRed2-seq forward* und *pDsRed2-reverse* verwendet werden. Beide setzen jeweils ca. 200 bp in 5'- und 3'-Richtung vom klonierten DNA-Fragment an. Da diejenigen Maserngene, die für die Proteine *M*, *N* und *P* kodieren in etwa dieselbe Größe haben, kann die PCR mit beiden Primern im selben Zeitfenster stattfinden. Eine Ausnahme bildet hier das L-Protein des MV. Es ist um ein vielfaches größer als die restlichen MV-Proteine. Um die PCR für alle Plasmide weiterhin unter Verwendung derselben PCR-Zeitintervalle ablaufen lassen zu können, wurde für diesen Vektor ein weiterer forward-Primer (*pDsRed2-C1-stop-L*) gewählt. Er setzt in einem Bereich des klonierten Inserts an,

der die Synthese eines, verglichen mit den MV-Genen M, N und P ähnlichen langen PCR-Produktes, zur Folge hat.

Nach erfolgter PCR wurden die vier Ansätze gelelektrophoretisch aufgetrennt (Abb. 4.21)

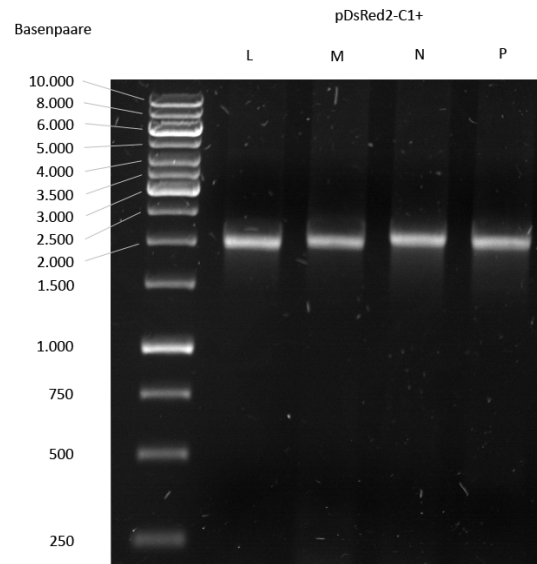
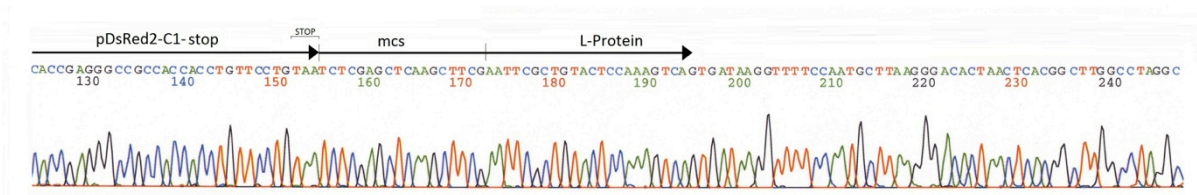


Abb. 4.21 | Gelelektrophorese nach durchgeführter PCR der vier Indikatorplasmide.

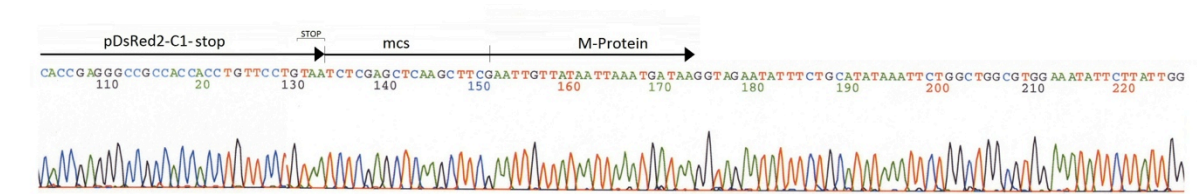
In den Spuren von links nach rechts: 1. Marker, 2. *pDsRed2-C1-stop-L*, 3. *pDsRed2-C1-stop-M*, 4. *pDsRed2-C1-stop-N*, 5. *pDsRed2-C1-stop-P*

Anschließend folgte die Sequenzierung der ligierten Vektoren mit dem Primer *pDsRed2-seq forward* um zu bestätigen, dass das klonierte Insert die korrekte Orientierung von 5' nach 3' aufwies (Abb.: 4.22 A-D).

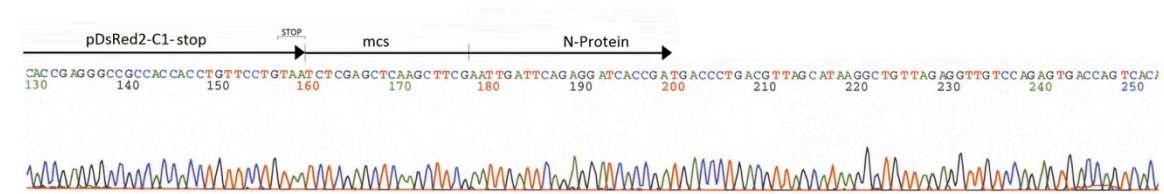
A



B



C



D

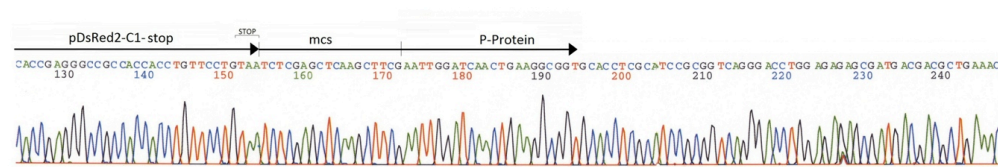


Abb. 4.22 | Sequenzierung der vier Indikatorplasmide *pDsRed2-C1-stop-L*, *-M*, *-N* und *-P*

mcs: multiple cloning site, **STOP**: Stop-Codon, **A**: *pDsRed2-C1-stop-L*, **B**: *pDsRed2-C1-stop-M*, **C**: *pDsRed2-C1-stop-N*, **D**: *pDsRed2-C1-stop-P*

Die Zusammenschau der Abbildungen 4.22 A-D zeigt die korrekte Insertion bzw. Orientierung der MV-Gene L, M, N und P in *pDsRed2-C1-stop* im Bereich der *mcs*.

4.1.2.3 Prüfung der Indikatorplasmide auf ihre Expression

Wird *pDsRed2-C1-stop* in Zellen transfiziert, sollte es im Zuge der Proteinbiosynthese zum Abschluss der Translation an dem durch die Mutagenese

eingefügten *Stop-Codon* kommen und das Fluoreszenzprotein *DsRed2* exprimiert werden.

Analog zu den in Kap. 4.1.1.1 durchgeführten Experimenten mit den shRNA exprimierenden Vektoren wurden 293T-Zellen in 6-well Platten ausgesät und über 24 h inkubiert. Anschließend folgte die Transfektion von 2 µg Plasmid-DNA mittels 5 µl *PEI* nach in Kap. 3.1.4.1 beschriebem Schema. 48 h nach der Transfektion erfolgte die durchflusszytometrische Messung zur Bestimmung einer möglichen Rotfluoreszenz in den transfizierten Zellen. Als Negativkontrolle dienten 293T-Zellen, welche lediglich mit 5 µl *PEI* ohne Plasmid-DNA versetzt wurden.

Das Ergebnis der Messungen ist in den Abbildungen 4.2.3 A-D aufgeführt.

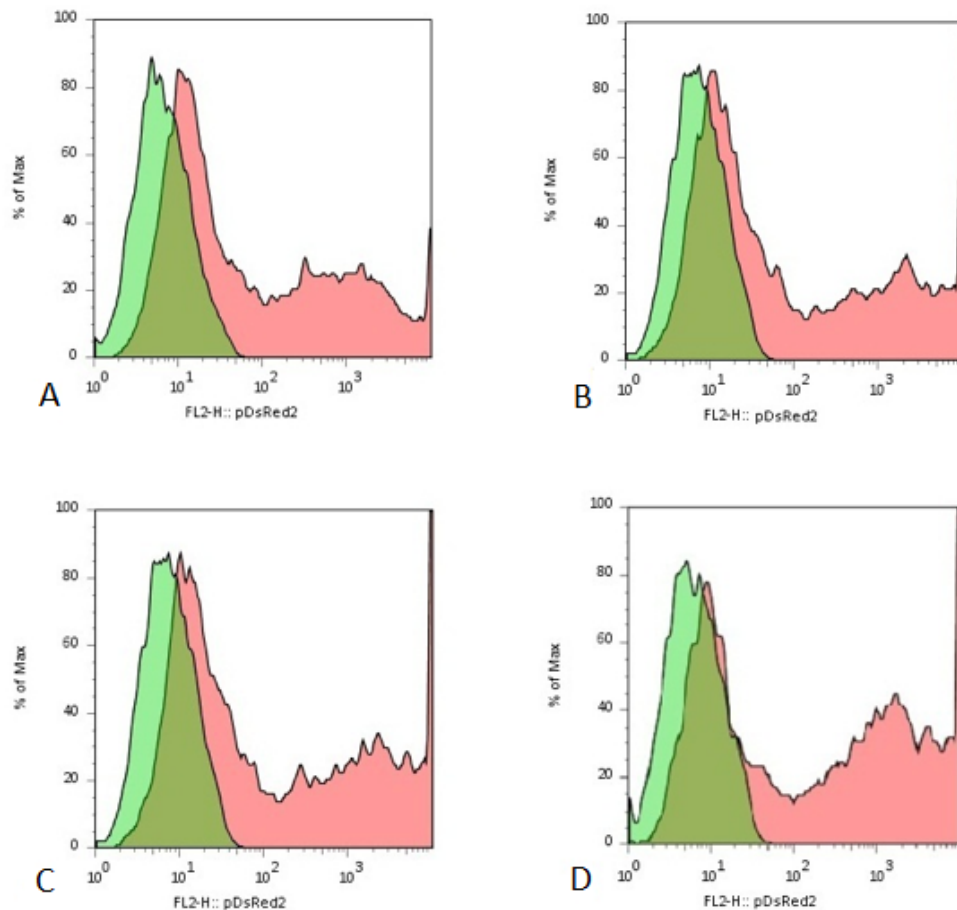


Abb. 4.23 | Expression von *DsRed2* nach Transfektion von *pDsRed2-C1-stop-L*, *-M*, *-N* und *-P* in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm

Negativkontrolle (grün) und Zellen, die mit Indikatorplasmiden transfiziert wurden (rot).
A: *pDsRed2-C1-stop-L*, **B:** *pDsRed2-C1-stop-M*, **C:** *pDsRed2-C1-stop-N*, **D:** *pDsRed2-C1-stop-P*

Die Zusammenfassung der FACS-Messungen, ersichtlich in den Abbildungen 4.23 A-D, zeigen die Rotfluoreszenz der mit den Indikatorplasmiden transfizierten Zellen im Vergleich zur Kontrolle, den lediglich mit *PEI* behandelten Zellen (grüner Peak). Dieser Effekt ist auf die Expression des Fluoreszenzproteins *DsRed2* in diesen Zellen zurückzuführen und bestätigt die Expression des Fluoreszenzproteins.

4.1.3 Testung verschiedener Zelllinien auf Transfektionseffizienz als Grundlage des *RNAi*-Quantifizierungssystems

Um eine gute Aussagekraft für das RNAi-Indikatorsystem zu erzielen ist eine entsprechend hohe Rate an transfizierten Zellen erforderlich. Da es Unterschiede bezüglich der Transfizierbarkeit unterschiedlicher Zelllinien gibt, musste untersucht werden, mit welchem Zelltyp die höchste Transfektionsrate erzielt werden kann. Hauptaugenmerk lag hier nicht auf der Transfektionseffizienz eines einzelnen Plasmids, sondern vielmehr auf der Kotransfektion - der gleichzeitigen Transfektion sowohl des lentiviralen Vektors als auch die des Indikatorplasmids in eine Zelle - und deren anschließende Expression. Nur mit einer relativ hohen Rate dieser doppelt-positiven Zellen ist es möglich verlässliche Aussagen über die Effektivität des Gene-silencings treffen zu können.

Es wurden insgesamt drei verschiedene Zelllinien (Vero-, HeLa- und 293T-Zellen) auf ihre Kotransfizierbarkeit getestet und für die Versuche auf 6-well Platten in folgenden Mengen ausgesät:

Zellart	Anzahl ausgesäter Zellen
Vero	2×10^5
HeLa	3×10^5
293T	$8,5 \times 10^5$

Tab. 4.2 | Verwendete Mengen an Zellen für die Überprüfung ihrer Fähigkeit zur Kotransfizierbarkeit

Anschließend wurde in jedes well 2 mL Medium hinzugefügt und ÜN inkubiert. 24 h später erfolgte die Transfektion mit in Tab. 4.3 aufgeführten DNA- und Transfektionsreagenzmengen (Protokoll s. 3.1.4):

Plasmidkombination	Menge DNA	Menge an Transfektionsreagenz (PEI)
Indikatorplasmid	7 µg	18 µl
Lentiviraler Vektor	2 µg	5 µl
Indikatorplasmid und lentiviraler Vektor	9 µg	23 µl

Tab. 4.3 | Eingesetzte Mengen von Plasmid-DNA und Transfektionsmedium (PEI)

In den Versuchen wurde jeweils als Indikatorplasmid *pDsRed2-C1-stop-P* und als *shRNA*-exprimierender Vektor der Kontrollvektor (*F6gW-ctrl*) verwendet, um eine sonst mögliche Abschwächung der Rotfluoreszenz durch Genknockdown mittels *RNAi* vorzubeugen.

48 Stunden später wurden die Zellen mit ATV vom Plattenboden der 6-well-Platten abgelöst und die Messung der transfizierten Zellen mittels FACS (s. Protokoll 3.1.5) durchgeführt. Die Auswertung erfolgte durch die Software *FlowJo*. Die Ergebnisse der Auswertung sind in der nachfolgenden Abb. 4.24 aufgetragen.

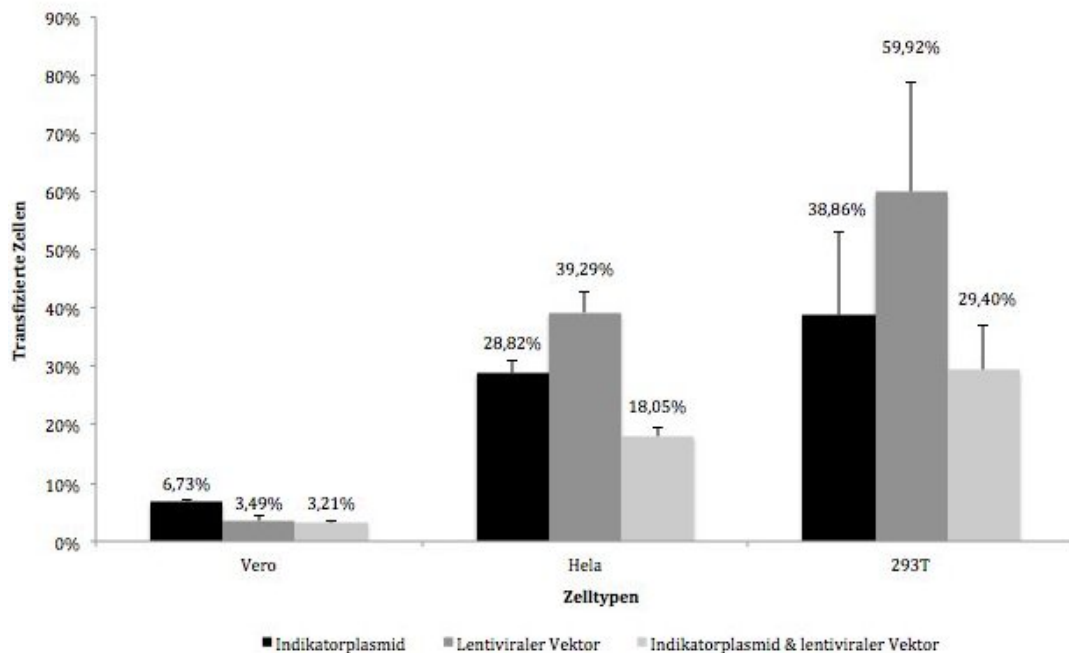


Abb. 4.24 | Übersicht der Transfektionseffizienz der getesteten Zellarten

Dargestellt ist die Rate der *pDsRed2* exprimierenden Zellen (schwarz), der *eGFP* exprimierenden Zellen (dunkelgrau) und die Rate der *eGFP* und *pDsRed2* exprimierenden Zellen (hellgrau), in Prozent.

293T-Zellen haben von allen drei getesteten Zelllinien die höchste Rate an doppelt positiven Zellen (29,40 %). Sowohl bei der Transfektion lediglich eines Vektors schneiden sie, bezogen auf die Transfizierbarkeit, mit 38,86 % für Indikatorplasmide und 59,92 % für lentivirale Vektoren, am besten ab. Vero-Zellen erwiesen sich mit einer im Durchschnitt bei 3,21 % liegenden Transfektionsrate bezüglich Doppeltransfektionen als ungeeignet. Zwar war die Transfektionseffizienz der HeLa-Zellen mit einem um ca. 5,6 mal höheren Faktor ungleich höher, schnitten aber im Vergleich zu 293T-Zellen schlechter ab.

Für die weiteren Versuche wurden fortan 293T-Zellen verwendet.

4.1.4 Vergleich des Zeitpunktes der Expression der Fluoreszenzproteine durch lentiviralen Vektor und Indikatorplasmid

Nach der erfolgten Bestimmung des für die Versuche zu verwendenden Zelltypes ist es ebenso wichtig den Zeitpunkt zu bestimmen, ab wann die jeweiligen Fluoreszenzmessungen durchgeführt werden sollten. So wurde untersucht nach welchem Zeitintervall die beiden Fluoreszenzproteine im Rahmen der Proteinbiosynthese ihre Wirkung voll entfaltet haben, d.h. die emittierten Fluoreszenzeigenschaften nach vorheriger Anregung mittels entsprechender Wellenlänge maximal sind.

293T-Zellen wurden nach Protokoll in 6-well-Platten ausgesät und 24 h später mit einerseits *pDsRed2-C1* und andererseits mit *F6gW* transfiziert, anschließend in 24-stündigen Abständen mittels ATV abgelöst und per Durchflusszytometrie gemessen. Als Transfektionsmedium diente *PEI*. In der sich anschließenden Auswertung wurde untersucht, inwieweit sich die Anzahl der fluoreszierenden Zellen und die Fluoreszenzintensität bezüglich der unterschiedlichen Zeitpunkte änderte. In Abb. 4.25 ist das Ergebnis aufgetragen.

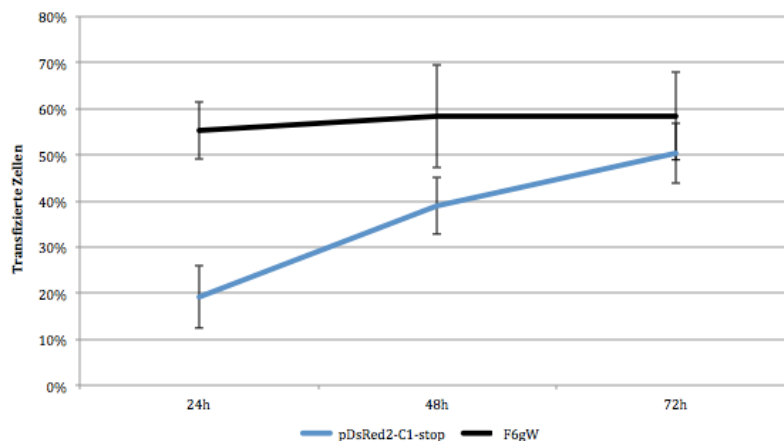


Abb. 4.25 | Vergleich bezüglich einer Entwicklung der Expression von *DsRed2* und *eGFP*

Es ist die prozentuale Menge der transfizierten Zellen bezüglich einer Expression des jeweiligen Fluoreszenzproteins aufgetragen (blau: *DsRed2*, schwarz: *eGFP*)

Abb. 4.25 zeigt, dass im Rahmen der *eGFP*-Synthese bereits nach 24 h eine Vielzahl der behandelten Zellen eine Expression dieses Fluoreszenzproteins

aufweisen. In den folgenden 48 h zeigt die Anzahl der *eGFP*-positiven Zellen einen eher konstanten Verlauf um die 60 %. Die Expression des *DsRed2*-Proteins zeigt im Gegensatz hierzu eine über die Zeit stets ansteigende Expression des *DsRed2*-Proteins. Im Mittel sind 50 % dieser 293T-Zellen nach etwa 72 h *pDsRed2*-positiv und liegen damit noch 10 % unterhalb den Werten, welche 293T-Zellen erzielen konnten, nachdem sie mit *pF6gW* transfiziert wurden.

Betrachtete man jedoch die nach 72 h gemessenen Zellen mit dem Durchlichtmikroskop, zeigten sich bereits viele sich aus Platzmangel von dem Plattenboden gelöste Zellen bei einer vollständigen Bedeckung mit dicht an dicht liegenden 293T-Zellen. Bezüglich den FACS-Auswertungen zeigten sich ebenso Veränderungen: Bei der Messung der Zellen und einer Auswertung dieser mit einem Auftragen von Vorwärts- und Seitwärtsstreulicht gegeneinander, zeigten diese pathologische Veränderungen im Vergleich zu den ansonsten gemessenen 293T-Zellen bezüglich ihrer Granularität und ihres Volumens. Diese Änderungen sind aller Wahrscheinlichkeit nach durch die im Zeitverlauf nicht mehr optimalen Kultivierungsbedingungen bedingt. Um etwaigen Messungenauigkeiten zuvorzukommen wurden die Zellen daher bereits nach 48 h ausgewertet, obwohl der prozentuale Anteil der *DsRed2*-positiven Zellen nach weiteren 24 h etwas höher lag.

4.2 Test der *shRNA*-Sequenzen im *RNAi*-Indikatorsystem

Nach Fertigstellung der in den vorangehenden Kapiteln beschriebenen Vorarbeiten konnte das Indikatorsystem nun erstmalig angewendet werden.

Hierzu wurden beide Plasmide, lentiviraler Vektor und Indikatorplasmid, simultan in 293T-Zellen transfiziert. Nach dem Aussäen von 8×10^5 293T-Zellen in 6-well-Platten wurden am folgenden Tag die Transfektionsansätze hinzugegeben. Diese beinhalteten sowohl DNA der einzelnen Indikatorplasmide, als auch die der lentiviralen Vektoren mit der in Tab. 4.4 angegebenen Menge.

Lentiviraler Vektor	Indikatorplasmid	PEI
2 µg	7 µg	23 µl

Tab. 4.4 | Eingesetzte Mengen von Plasmid-DNA und Transfektionsmedium *PEI* in der Anwendung des *RNAi*-Indikatorsystems

Die Transfektionen erfolgten nach in Kap. 3.1.4.1 angegebenem Protokoll. 48 h post transfectionem wurden die Zellen mit Hilfe von ATV vom Boden den 6-well Platten gelöst und mittels FACS die Rot- sowie Grün-Fluoreszenz gemessen. Die sich anschließende Auswertung erfolgte mit der Software *FlowJo*®. Hierbei wurden in einem Histogramm grün und rot fluoreszierende Zellen aufeinander aufgetragen (s. Abb. 4.26). Findet eine Degradation der die genetische Information für *DsRed2* tragenden mRNA statt, sollten sich im Vergleich zur Kontrolle (*pF6gW-ctrl* und Indikatorplasmid) quantitativ weniger Zellen im rotpositiven Bereich befinden sowie die durchschnittliche Rotfluoreszenz ebenfalls erniedrigt sein.

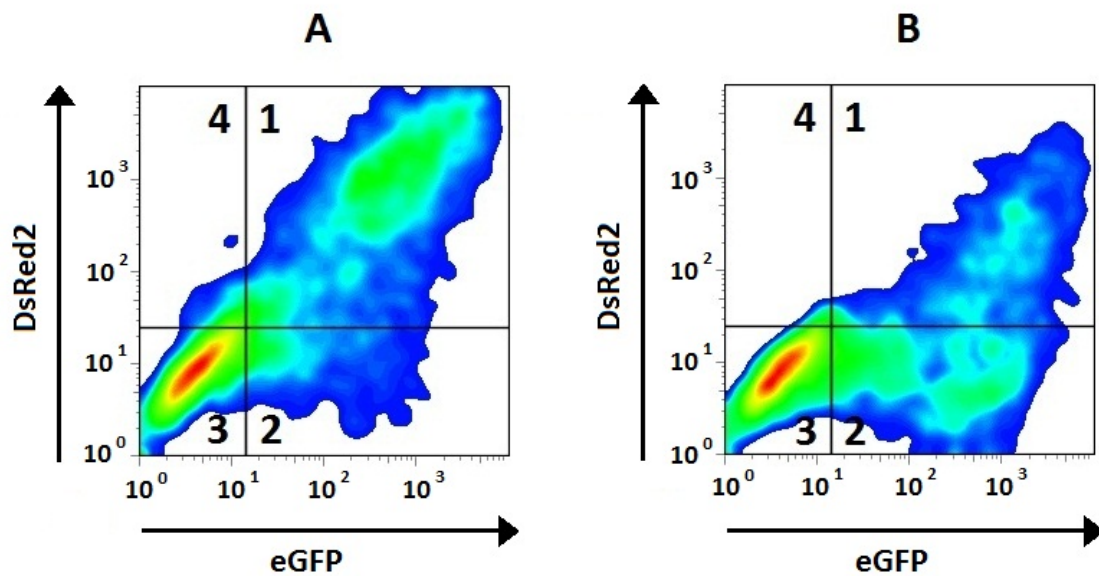


Abb. 4.26 | Beispielhafte Darstellung der FACS-Auswertung des Indikatorsystems

A Kotransfektion Indikatorplasmid und Kontroll-shRNA, **B** Kotransfektion Indikatorplasmid und shRNA

Gates: 1 *eGFP* positiv/ *DsRed2* positiv 2 *eGFP* positiv/ *DsRed2* negativ 3 *eGFP* negativ/ *DsRed2* negativ 4 *eGFP* negativ/ *DsRed2* positiv

Bei einer erfolgreichen Degradation der die Information für *DsRed2* tragenden mRNA sollte sich im Vergleich zur Kontrolle die Zellzahl in Gate 1 vermindern und in Gate 2 erhöhen.

Bezüglich der Auswertung der durchschnittlichen Rotfluoreszenzen in den untersuchten Zellen wurde eine Auswahl zweier unterschiedlicher Gates getroffen. Einerseits wurden alle gemessenen Zellen einbezogen (s. Abb. 4.27A) und zusätzlich nur diejenigen Zellen ausgewertet, die im grünpositiven Bereich anzutreffen waren (s. Abb. 4.27B). Nur in den letztgenannten Zellen findet die Translation der *shRNAs* statt. Somit bleiben Zellen, die sich dem Vorgang der *RNAi* entziehen unberücksichtigt.

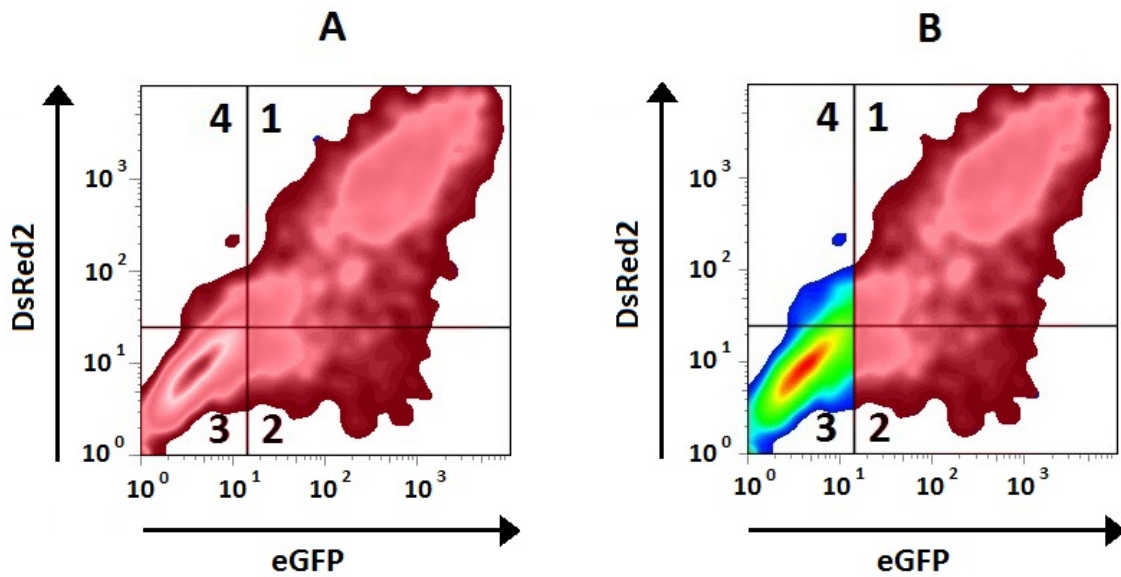


Abb. 4.27| Darstellung beider Auswertungsformen

Die in der jeweiligen Auswertung erfassten Zellen sind rötlich eingefärbt.

A In dieser Auswertung werden alle in einer Probe erfassten Zellen (Gates 1, 2, 3 und 4) zur Auswertung der Rotfluoreszenz verwendet. **B** Hier werden nur die *eGFP* exprimierenden Zellen (Gates 1 und 2) in die Auswertung einbezogen, da nur in diesen Zellen eine Expression von *shRNAs* stattfindet.

Zur Unterscheidung beider Auswertungsmuster werden im Folgenden, sofern die Gates 1-4 in die Auswertung einbezogen wurden (Abb. 4.27A), diese als „alle Zellen“ und bei einer ausschließlichen Berücksichtigung von *eGFP*-positiven Zellen, diese als „Zellen in Gate 1 und 2“ bezeichnet. In den folgenden Kapiteln 4.2.1 bis 4.2.4 sind die Ergebnisse der Messungen innerhalb des Indikatorsystems in Form von Schaubildern zusammengefasst. Insgesamt wurde jeder der Versuche je 5 bis 6 mal durchgeführt. Die genaue Anzahl ist jeweils angegeben. Zusätzlich zu der Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz wurden die Zellen in den Gates 1 und 2 gezählt, um zu sehen ob es bei der Anwendung der *shRNA*-exprimierenden Vektoren eine mengenmäßige Zunahme in Gate 2 stattfindet. Verglichen wurde jeder *shRNA*-exprimierende Vektor mit *pF6gW-ctrl* indem die gemessenen Werte von Rotfluoreszenz und gezählter Zellen gleich 100 % gesetzt wurden. Die abschließende Bewertung der gesammelten Ergebnisse findet sich im Anschluss in Kap. 4.2.5.

4.2.1 Test der gegen das L-Protein gerichteten *shRNA*-Sequenzen

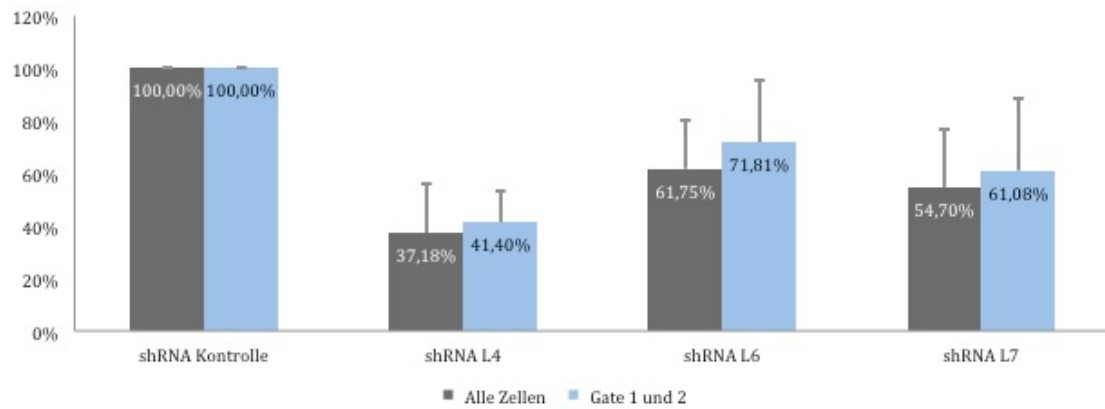


Abb. 4.28 | Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von *pF6gW-L4*, *-L6* und *-L7* und *pDsRed2-C1-stop-L*

Anzahl der durchgeführten Versuche: 6

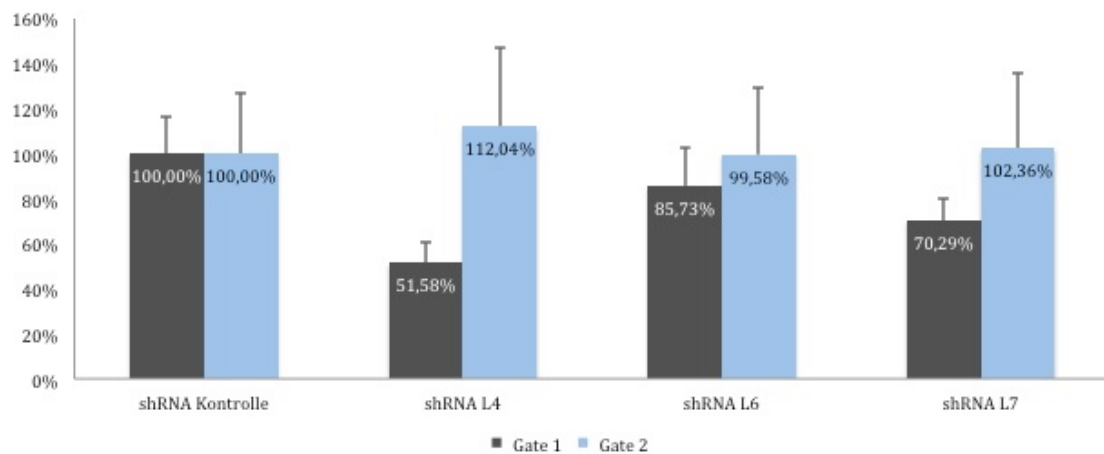


Abb. 4.29 | Auswertung der Anzahl der Zellen in den Gates 1 und 2 bei einer Anwendung von *pF6gW-L4*, *-L6* und *-L7* und *pDsRed2-C1-stop-L*

Anzahl der durchgeführten Versuche: 6

4.2.2 Test der gegen das M-Protein gerichteten shRNA-Sequenzen

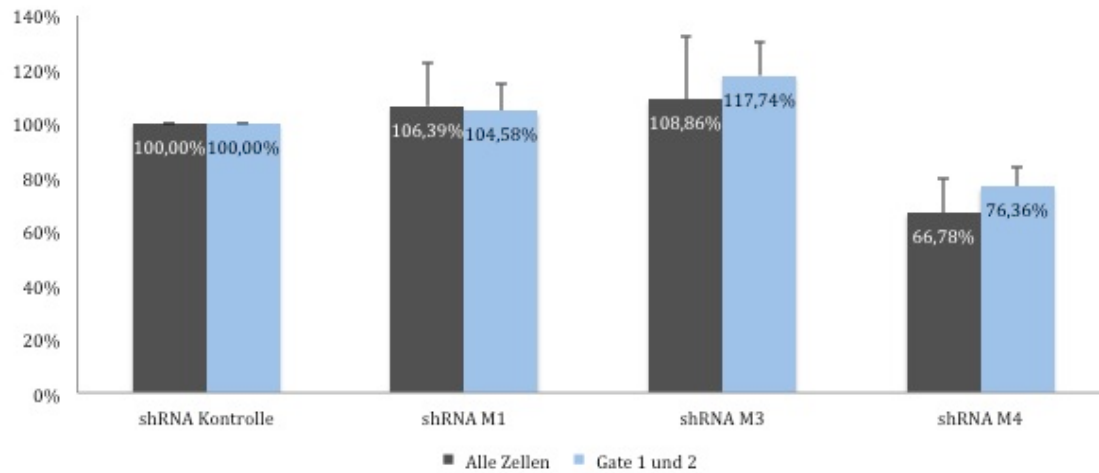


Abb. 4.32 | Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von *pF6gW-M1*, *-M3* und *-M4* und *pDsRed2-C1-stop-M*

Anzahl der durchgeführten Versuche: 5

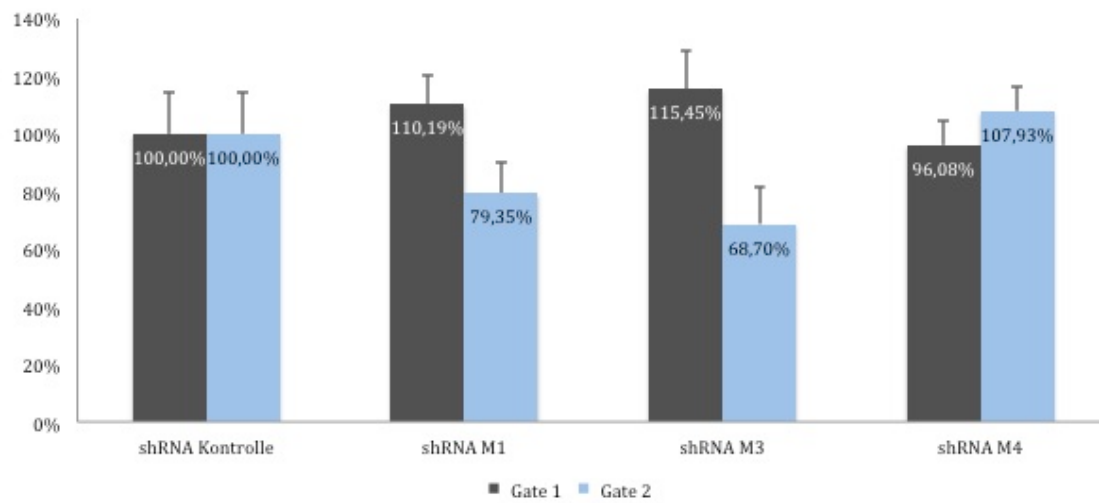


Abb. 4.33 | Auswertung der Anzahl der Zellen in den Gates 1 und 2 bei einer Anwendung von *pF6gW-M1*, *-M3* und *-M4* und *pDsRed2-C1-stop-M*

Anzahl der durchgeführten Versuche: 5

4.2.3 Test der gegen das N-Protein gerichteten *shRNA*-Sequenzen

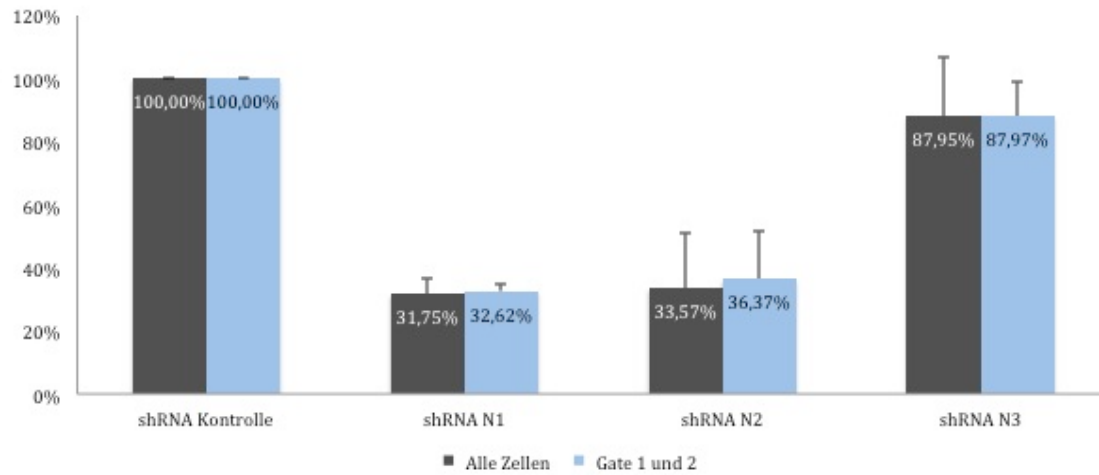


Abb. 4.34 | Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von *pF6gW-N1*, *-N2* und *-N3* und *pDsRed2-C1-stop-N*

Anzahl der durchgeführten Versuche: 6

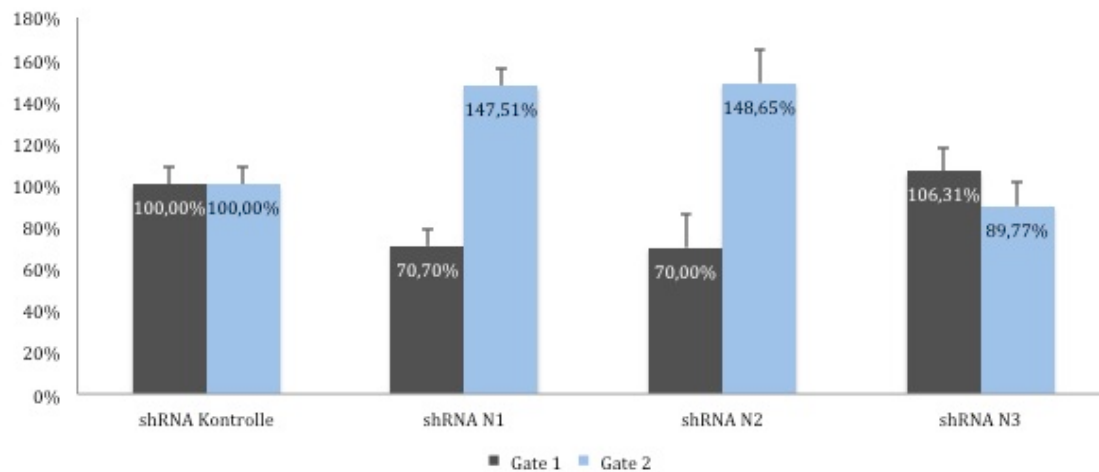


Abb. 4.35 | Auswertung der Anzahl der Zellen in den Gates 1 und 2 bei einer Anwendung von *pF6gW-N1*, *-N2* und *-N3* und *pDsRed2-C1-stop-N*

Anzahl der durchgeführten Versuche: 6

4.2.4 Test der gegen das P-Protein gerichteten *shRNA*-Sequenzen

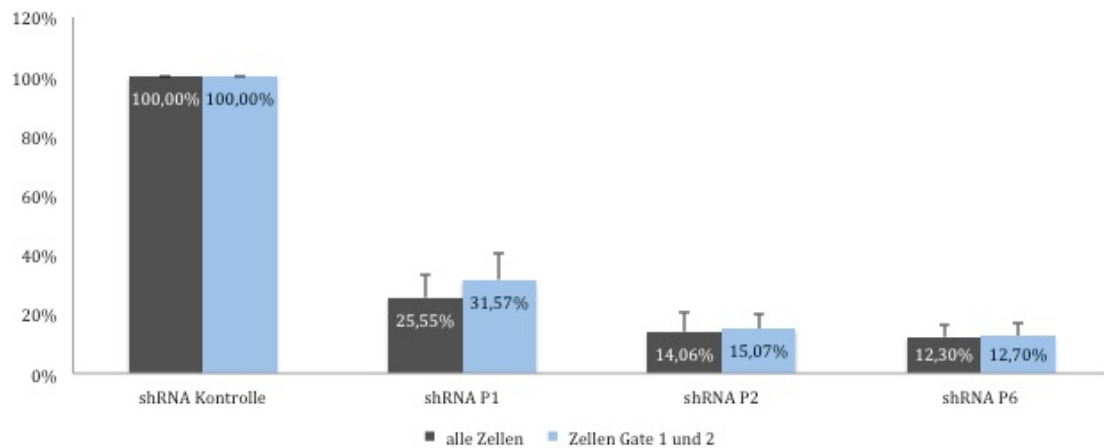


Abb. 4.36 | Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von *pF6gW-P1*, *-P2* und *-P6* und *pDsRed2-C1-stop-P*

Anzahl der durchgeführten Versuche: 6

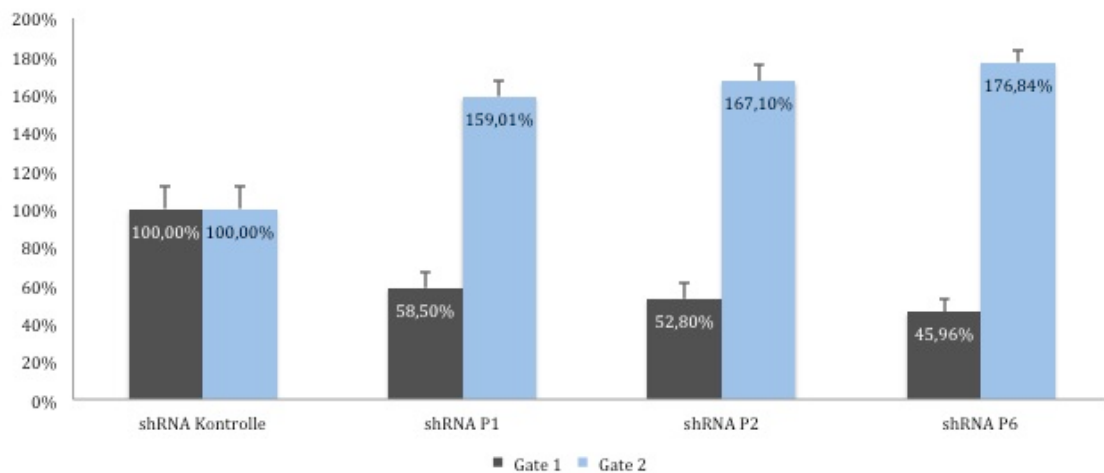


Abb. 4.37 | Auswertung der Anzahl der Zellen in den Gates 1 und 2 bei einer Anwendung von *pF6gW-P1*, *-P2* und *-P6* und *pDsRed2-C1-stop-P*

Anzahl der durchgeführten Versuche: 6

4.2.5 Auswertung des *RNAi*-Indikatorsystems

Bezüglich der Auswertungen, dargestellt in den Kap. 4.2.1 bis 4.2.4, zeigten folgende *shRNAs* eine im Vergleich zu den anderen verwendeten *shRNAs* maximale Minderung bezüglich der Intensität der Rotfluoreszenz sowie die größte Differenz an gezählten Zellen in den Gates 1 und 2:

<i>shRNA</i>	Abnahme der Rotfluoreszenz im Vergleich zu <i>shRNA-ctrl</i> in %*	Abnahme der Zellzahl in Gate 1 im Vergleich zu <i>shRNA-ctrl</i> in %	Zunahme der Zellzahl in Gate 2 im Vergleich zu <i>shRNA-ctrl</i> in %
L4	62,82 % / 58,60 %	48,42 %	12,04 %
M4	33,22 % / 23,64 %	3,92 %	7,93 %
N1	68,25 % / 67,38 %	29,3 %	47,51 %
P6	87,70 % / 87,30 %	54,04 %	76,84 %

Tab. 4.5 | Zusammenfassung der ausgewählten *shRNAs*

* [alle Zellen / Gate 1 und 2]

Die in Tab. 4.5 dargestellten *shRNAs* wurden aufgrund ihrer Fähigkeit eines größtmöglichen Genknockdowns der einzelnen MV-Proteine für die folgenden Experimente weiterverwendet.

4.2.6 Test der nicht-komplementären *shRNA*-Sequenzen

In Kap. 4.1.1 wurde bereits beschrieben, dass nach erfolgter Synthese und Klonierung der DNA-Oligonukleotide in die *shRNA*-Expressions-kassette von *pF6gW* die nachfolgenden Sequenzierungen dieser einklonierten Sequenzen Fehler beinhalteten. So entstanden *pF6gW-N2a* und *-P6a*. Dennoch wurden diese Sequenzen verwendet um ihre Fähigkeit bezüglich eines Knockdowns des zugehörigen Proteins im Rahmen der *RNAi* zu untersuchen und mit *pF6gW-N2* und *-P6* zu vergleichen.

Der dazugehörige Versuchsaufbau und die Auswertung erfolgte analog zu den bereits in Kap. 4.2.1 – 4.2.4 durchgeführten Experimenten. Nicht dargestellt ist die Auswertung der gezählten Zellen aus Gate 1 und 2.

Die Ergebnisse dieses Experiments sind in den Abb. 4.38 und 4.39 aufgeführt.

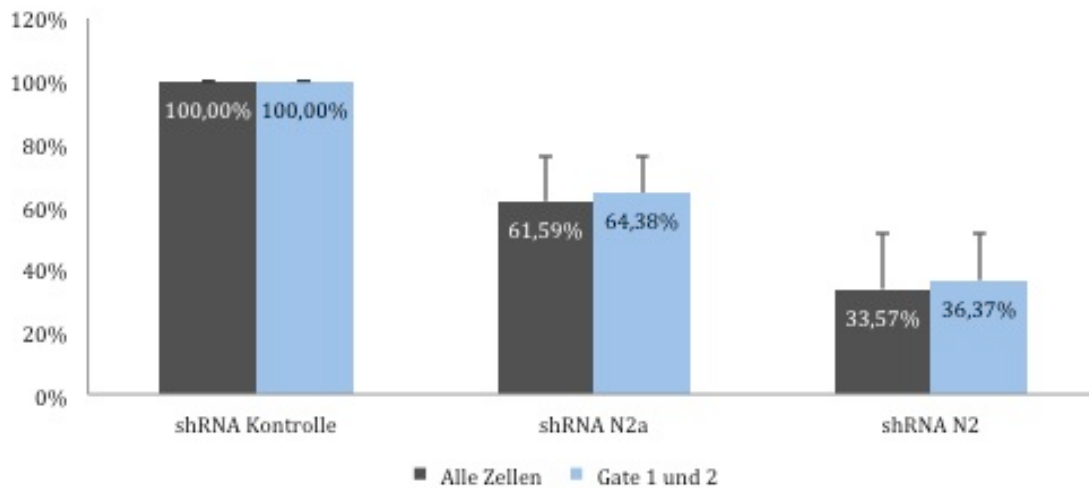


Abb. 4.38 | Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von *pF6gW-N2a* und *pDsRed2-C1-stop-N* verglichen mit *pF6gW-N2*

Anzahl der durchgeführten Versuche: 6

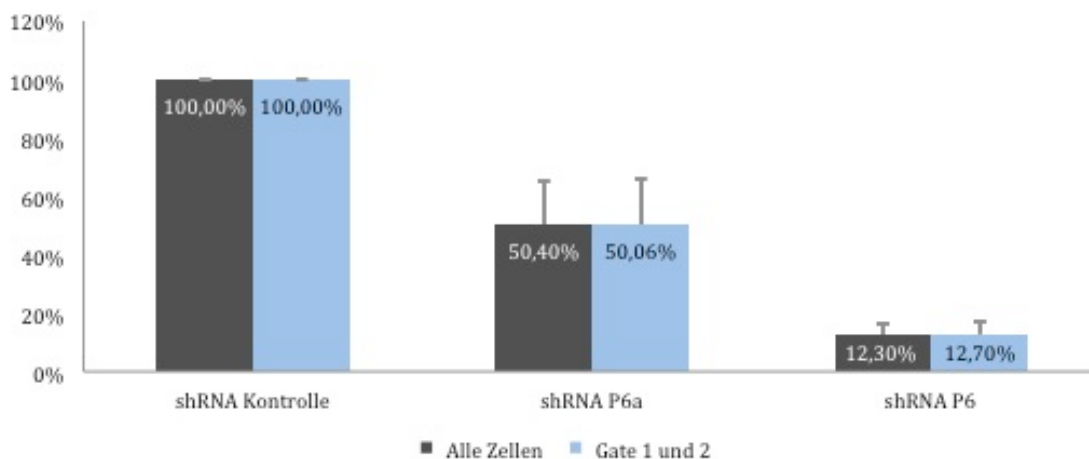


Abb. 4.39 | Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von *pF6gW-P6a* und *pDsRed2-C1-stop-P* verglichen mit *pF6gW-P6*

Anzahl der durchgeführten Versuche: 6

Die nicht exakt übereinstimmenden shRNA-Sequenzen *N2a* und *P6a* führen zwar ebenfalls zu einem Knockdown des Zielproteins N und P, dieser ist allerdings nicht im selben Maße stark ausgeprägt wie unter der Verwendung von *pF6gW-N2* und *-P6*.

So führte die Verwendung von *pF6gW-N2a* zu einer Reduktion der Rotfluoreszenz auf 61,5 % bzw. 64,38 % im Vergleich zu *F6gW-ctrl*. Diesbezüglich erbrachte die Verwendung von *F6gW-N2* aus vorangegangenen Versuchen Werte von 33,57 % bzw. 36,37 % an Intensität der Rotfluoreszenz im Vergleich zur Kontrolle. Noch weiter gemindert wurde die Wirkung der shRNA *P6a* verglichen mit *P6*. *P6a* erbrachte eine Reduktion um die 50 % im Vergleich zur Kontrolle. *P6* dagegen konnte in den vorangegangenen Versuchen eine Reduktion von fast 90 % bewirken.

Dies zeigt, wie auch relativ geringe Veränderungen innerhalb der *siRNAs* bzw. *shRNAs* zu einem nicht unerheblichen Wirkungsverlust bezüglich eines Genknockdowns führen, jedoch eine Hemmung der Proteinbiosynthese noch immer möglich ist.

4.3 Test der RNAi auf Inhibition der Virusreplikation in vitro

Mit der Kenntnis der wirkungsvollsten *shRNA*-Sequenzen sollte nun in einem weiteren Schritt getestet werden, ob die durch sie hervorgerufene Inhibition der Translation gewisser viraler Masernproteine Einfluss auf das virale Infektionsgeschehen genommen werden kann.

Es wurden diesbezüglich zwei unterschiedliche Infektionsstadien simuliert. Zum Einen den Vorgang der akuten Infektion, sowie die ebenfalls durch Masernviren ausgelösten chronischen bzw. persistierenden Infektionen innerhalb eines Zellmodells.

4.3.1 Test der shRNA-Sequenzen auf die Inhibierung einer akuten viralen Infektion

Um die akute Infektion zu simulieren wurden 293T-Zellen in 6-well-Platten ausgesät und ÜN inkubiert. Nach Vorliegen eines ca. 90 % den Boden des jeweiligen wells bedeckenden Monolayers wurden die Zellen simultan sowohl mit *MV^{Etag}CAMHeGFP* infiziert als auch mit den Plasmiden *pF6gW-L4*, *-M4*, *-N1* und *-P6* transfiziert. Dazu wurden die Transfektionsansätze mit 2 µg des jeweiligen lentiviralen Vektors nach Protokoll (s. Kap. 3.1.4.1) hergestellt und auf die Zellen pipettiert. Als Kontrolle diente in diesem Versuch die Verwendung des Plasmids *pF6gW-ctrl*. Das MV wurde mit einer MOI von 0,1 auf die Zellen pipettiert und

diese ÜN im Brutschrank inkubiert. Am folgenden Tag wurde das Medium vollständig von den Zellen entfernt und diese einmalig mit LB-Medium gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit 2 mL LB-Medium überdeckt und nochmals im Brutschrank ÜN inkubiert. Am folgenden Tag erfolgte die Betrachtung und Auswertung der Zellen via Fluoreszenzmikroskop.

Die aufgenommenen Bilder sind der Abb. 4.40 zu entnehmen.

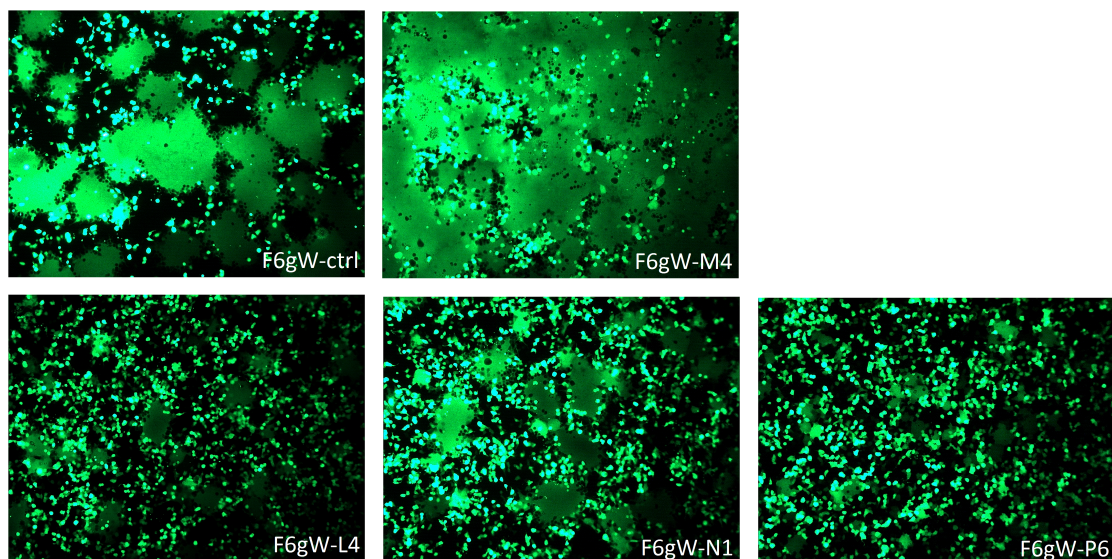


Abb. 4.40 | Aufnahmen simultan in- und transfizierter Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop

Die dargestellten Synzytien, abgebildet in Abb. 4.40, sind bei der Anwendung von *pF6gW-L4*, *-N1* und *-P6* deutlich kleiner im Vergleich zu der Anwendung des Kontrollplasmides *pF6gW-ctrl*. Zellen, die mit dem Plasmid *pF6gW-M4* transfiziert wurden zeichnen sich durch eine deutliche Größenzunahme der Synzytien aus, einem Effekt der im Rahmen einer Anwendung von *siRNAs* gegen das M-Protein des MV bereits in Vorarbeiten beschrieben wurde [42].

Dies zeigt, dass eine Expression der shRNAs *L4*, *N1* und *P6* bei akuten Infektionen die virale Replikation zu hemmen vermag und die Anwendung der shRNA *M4* dem MV zu einer Steigerung der viralen Replikationsrate verhilft. Auf weitere Untersuchungen zur Inhibition bzw. Förderung akuter Infektionen durch

die Mechanismen der *RNAi* wird an dieser Stelle verzichtet, da dies in Vorarbeiten schon eingehend untersucht wurde [42].

4.3.2 Die *shRNA*-Sequenzen *L4*, *M4*, *N1*, *P6* und ihre Anwendung bei persistierend-infizierten Zellkulturen

In einem weiteren Schritt sollte untersucht werden, inwieweit mithilfe der *RNAi* persistierende MV-Infektionen, dem eigentlichen Vorgang im Zuge von MV-Infektionen des ZNS bezüglich der *SSPE*, *in vitro* inhibiert werden können.

Hierzu wurden NT2-Zellen verwendet, eine gut charakterisierte pluripotente humane testikuläre embryonische Zelllinie, die, wenn mit Retinolsäure behandelt, phänotypisch die Gestalt neuronaler Vorläuferzellen annehmen können [212]. Aus Vorarbeiten ist zudem bekannt, dass in ihnen eine persistierende MV-Infektion erzeugt und aufrechterhalten werden kann [213].

Die ausgewählten *shRNA*-exprimierenden Plasmide (Kap. 4.2.5) wurden dazu verwendet *VSV-G-pseudotypisierte lentivirale Partikel* zu generieren. Diese sind nach erfolgter Transduktion in die jeweiligen Zielzellen in der Lage ihr Genom in deren zelluläre DNA zu integrieren und somit eine langanhaltende Expression des transduzierten genetischen Materials zu bewirken.

Um eine durchflusszytometrische Messung durchführen zu können wurde *MVEntagCAMHeHCRred* verwendet. Ein MV, das in infizierten Zellen im Rahmen der Proteinbiosynthese die Expression des roten Fluoreszenzproteins *HCRred* herbeiführt. Somit können sowohl infizierte als auch transduzierte Zellen durch die simultan bestehende Rot- und Grünfluoreszenz erkannt werden

4.3.2.1 Herstellung persistierend infizierter NT2-Zellen mit *MVEntagCAMHeHCRred*

Die Generierung *persistierend infizierter NT2-Zellen (piNT2)* wurde analog zum Protokoll in Kap. 3.4.9 durchgeführt und mittels regelmäßigen Kontrollen durch Fluoreszenzmikroskopie auf Wachstum, Vitalität und Infektion untersucht.

Abb. 4.41 zeigt verschiedene Stadien der Generierung und Kultivierung der Zellen im zeitlichen Verlauf.

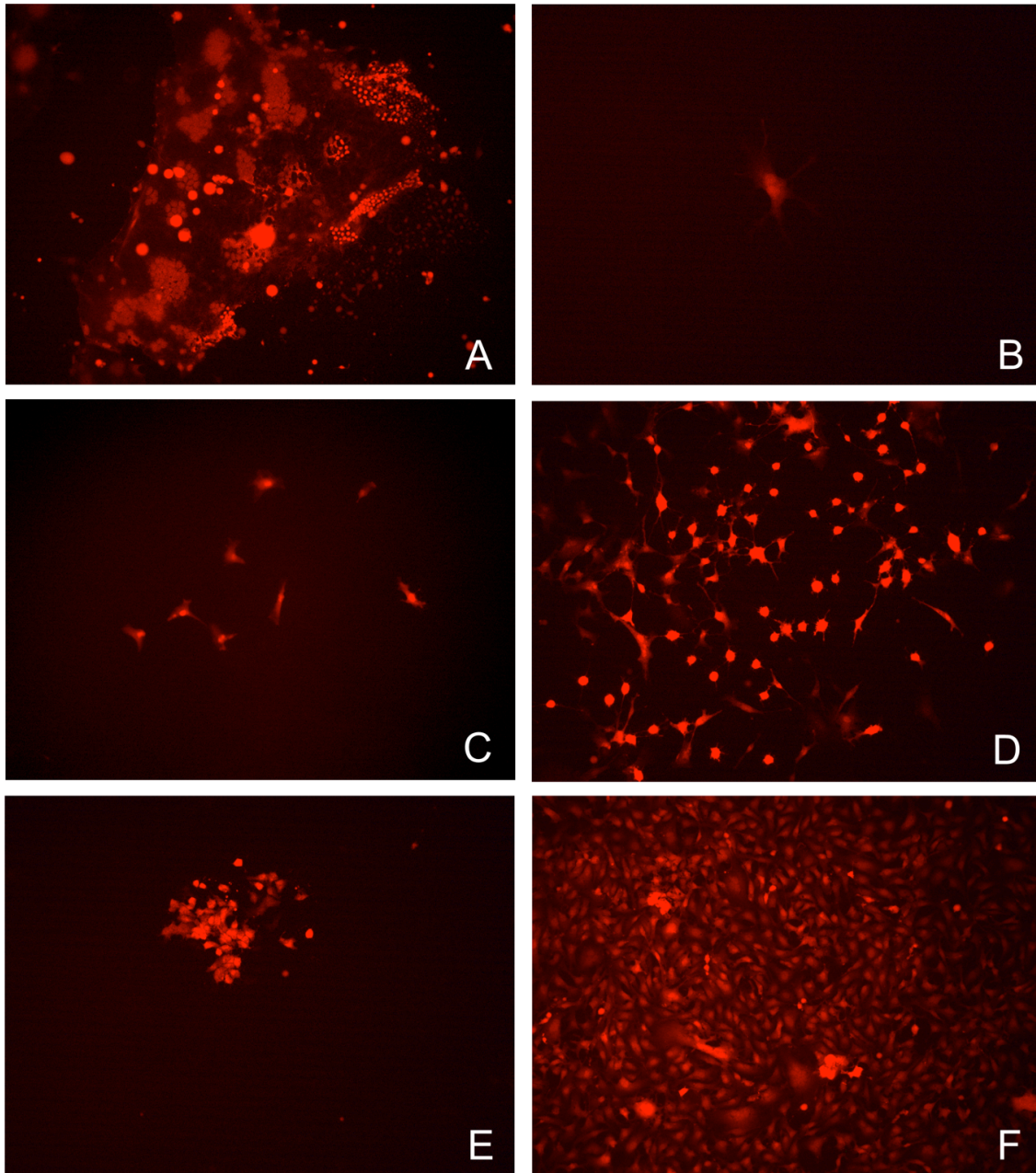


Abb. 4.41 | Stadien der Entwicklung einer mit *MVEntagCAMHeHCRed* persistierend infizierten NT2-Zelllinie in chronologischer Reihenfolge

A zeigt das akutes Stadium einer Infektion mit der Bildung großer Synzytien (ca. 24 h post infectionem). In **B** ist eine nach ca. 4 - 7 Tagen infizierte Zelle zu erkennen, die zwar rot fluoresziert, jedoch initial kein Synzytium bildet. In **C** und **D** ist zu erkennen wie die Anzahl der rot fluoreszierenden Zellen ohne Synzytienbildung im zeitlichen Verlauf innerhalb der folgenden 3 Wochen post infectionem zunimmt. Weiterhin fallen viele dieser Zellen dem Zelltod anheim. Es entstehen jedoch Zellnester, von denen ausgehend die persistierende Infektion aufrechterhalten wird (**E**). **F** zeigt eine Aufnahme des Endstadiums, in dem alle erkennbaren in der Kultur befindliche Zellen infiziert sind und keine Synzytien bilden.

Hatte die Zellkultur das Bild aus Abb. 4.41F angenommen erfolgte eine Messung dieser Zellen mit dem Durchflusszytometer. Hierfür wurden die Zellen zunächst mittels ATV vom Boden der Zellkulturflaschen abgelöst und gemäß Protokoll in Kap. 3.1.5 für die FACS-Messungen vorbereitet. Als Kontrolle dienten nichtinfizierte NT2-Zellen, die ebenfalls auf eine rotfluoreszierende Eigenschaft untersucht wurden.

Das Ergebnis ist in Abb. 4.42 dargestellt:

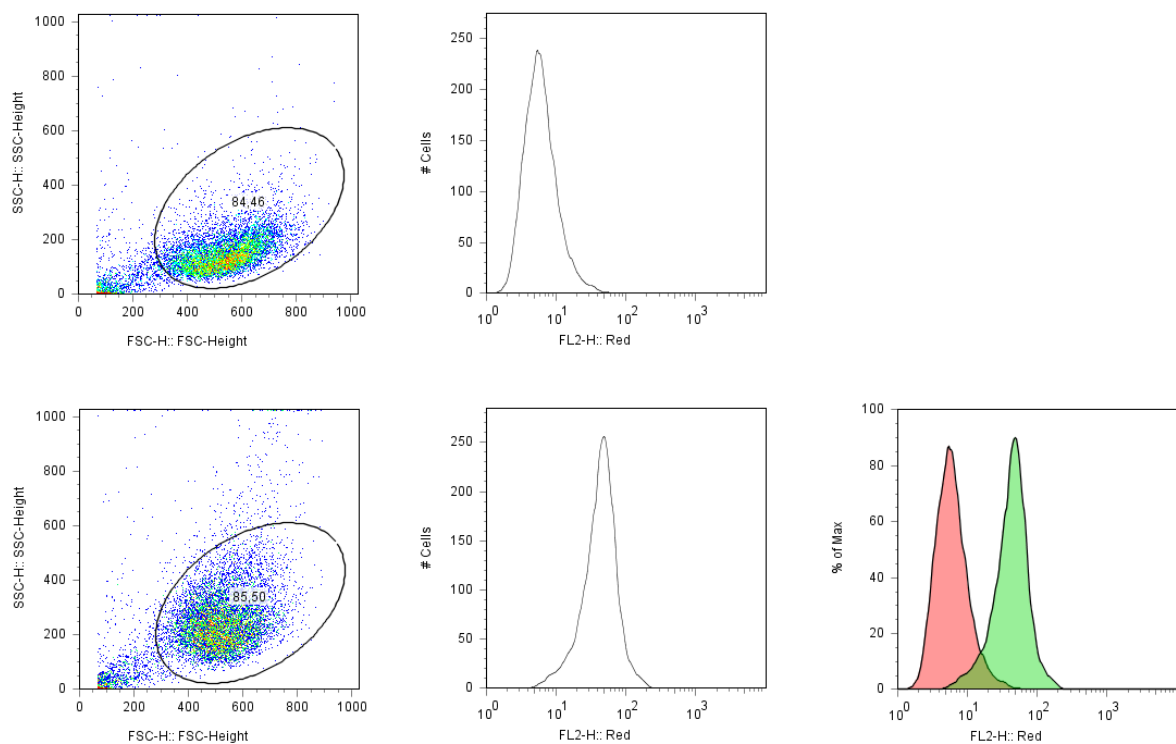


Abb. 4.42 | FACS-Auswertung der persistierend infizierten NT2-Zellen

In der oberen Reihe sind die untersuchten nichtinfizierten NT2-Zellen dargestellt und deren Verteilung im Histogramm. Die untere Reihe zeigt piNT2 und deren Verteilung im Histogramm. Im rechten unteren Bild sind die Histogramme der untersuchten nichtinfizierten NT2-Zellen (rot) und der piNT2-Zellen (grün) gegeneinander aufgetragen dargestellt.

Die in Kultur befindlichen Zellen zeigen eindrücklich die Expression des Fluoreszenzproteins *HCR*, was gleichbedeutend mit der viralen MV-Replikation und damit bei gleichzeitigem Fehlen einer Synzytienbildung Ausdruck einer persistierenden Infektion des *MVE* *tagCAMHeHCR* ist.

Um die gleichzeitige Expression viraler Proteine des MV der rot fluoreszierenden Zellen aufzuzeigen, wurden diese Zellen mit entsprechenden Antikörpern untersucht. Dazu wurden die Zellen mit ATV vom Boden der Zellkulturflaschen gelöst und davon 1×10^5 in FACS-Röhrchen überführt und mit FACS-Puffer gewaschen. Anschließend wurden sie mit 3,7%igem Paraformaldehyd und 0,25%igem Triton X-100 permeabilisiert. Es folgte die Zugabe des Primärantikörpers *Mab F227* (anti-MV-N; 1:100). Nach der Inkubationszeit wurde der grün fluoreszierende Zweitantikörper *Alexa 488* (Ziege, anti-Maus; 1:100) hinzugegeben. Es folgte anschließend die durchflusszytometrische Messung und Auswertung. Im Falle einer Expression des viralen N-Proteins müsste sowohl Erst- als auch Zweitantikörper durch deren spezifische Bindung an die Zelloberfläche von mit MV befallenen Zellen innerhalb der FACS-Messung zu einer grünen Fluoreszenz führen. Als Kontrolle dienten wiederum nichtinfizierte NT2-Zellen, welche mit denselben Antikörpern behandelt wurden.

Das Ergebnis dieser Messungen ist in Abb. 4.43 dargestellt.

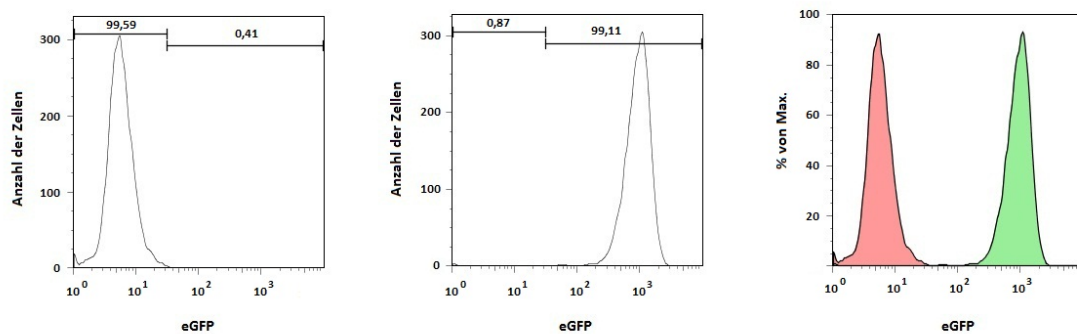


Abb. 4.43 | FACS-Auswertung der piNT2-Zellen nach Antikörperfärbung

Von links nach rechts ist die Anzahl der Zellen bezüglich ihrer Intensität der Grünfluoreszenz im Histogramm zu erkennen: Nichtinfizierte NT2-Zellen, piNT2-Zellen, Zusammenschau nichtinfizierter NT2-Zellen (rot) und piNT2-Zellen (grün).

Die mit MV infizierten in Kultur befindlichen Zellen sind deutlich positiv bezüglich der Antikörperbindung an das virale Nukleokapsidprotein. Somit kann in den rot fluoreszierenden Zellen definitiv von einer viralen Replikation und Expression der MV-Proteine ausgegangen werden.

4.3.2.2 Herstellung von lentiviralen Partikeln mit den ausgewählten *shRNA*-Sequenzen

Die im Rahmen der Versuche in Kap. 4.2 untersuchten *shRNA* exprimierenden Plasmide, die innerhalb des *RNAi*-Indikatorsystems zu einem quantitativ größten Gen-Knockdown führten (*pF6gW-L4*, *pF6gW-M4*, *pF6gW-N1*, *pF6gW-P6*), wurden zusammen mit *pF6gW-Kontrolle* für die weiteren Versuche verwendet. Zusammen mit den Plasmiden *pVSVg*, *pRSV-Rev*, *pMD2.G* und *pMDLg/pRRE* wurden durch deren Transfektion in 293T-Zellen pseudotypisierte lentivirale Partikel generiert (Protokoll s. Kap. 3.4.3).

Um zu überprüfen, ob die erzeugten Partikel zur Transduktion und anschließender Genexpression fähig waren, wurde mit 293T-Zellen in 48-well-Platten eine Endpunkttitration durchgeführt. Sollte es in den transduzierten Zellen zu einer Expression von *eGFP* kommen, kann gleichzeitig von einer Integration der *shRNA*-Konstrukte in die weiter am 5'-Ende liegende Expressionskassette ausgegangen werden. Zusätzlich wurde als Positivkontrolle eine Verdünnungsreihe lentiviraler Partikel, welche ausschließlich die genetische Information von *pF6GW* ohne zuvor einkloniertes *shRNA*-Konstrukt, in die Zellen transduziert. Im Folgenden werden die fluoreszenzmikroskopischen Aufnahmen der verschiedenen Endpunkttitrationen einer jeden Gruppe der erzeugten lentiviralen Partikel aufgeführt (Abb. 4.44 - 4.49).

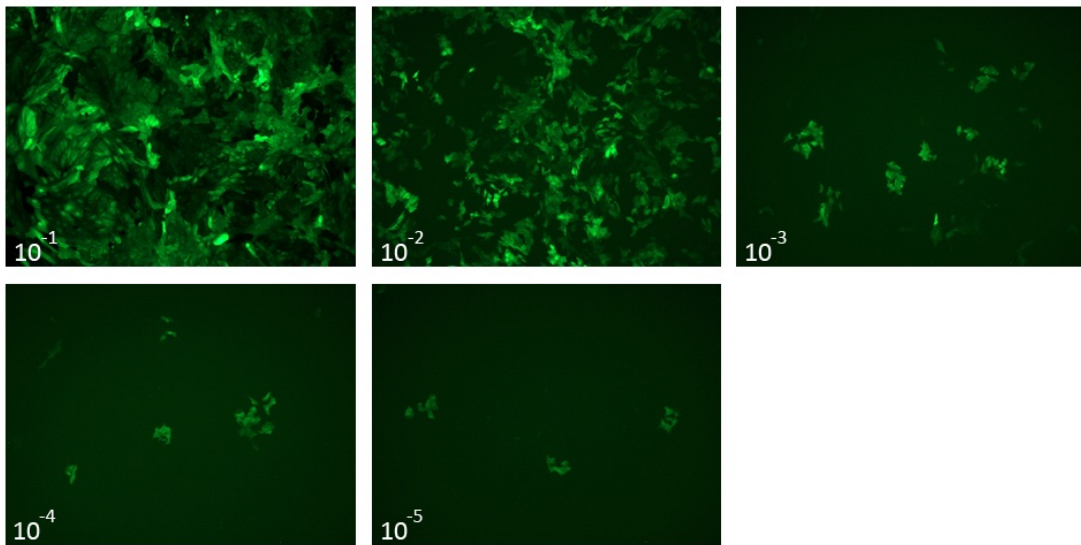


Abb. 4.44 | 293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit *pF6gW* ("mock"-Vektor, Positivkontrolle) und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert

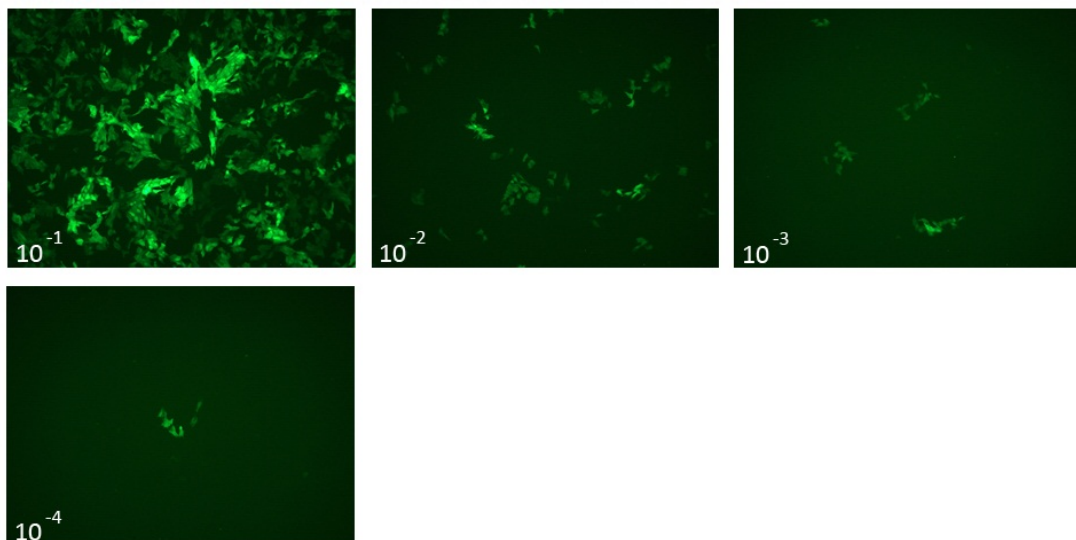


Abb. 4.45 | 293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit *pF6gW-ctrl* und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert

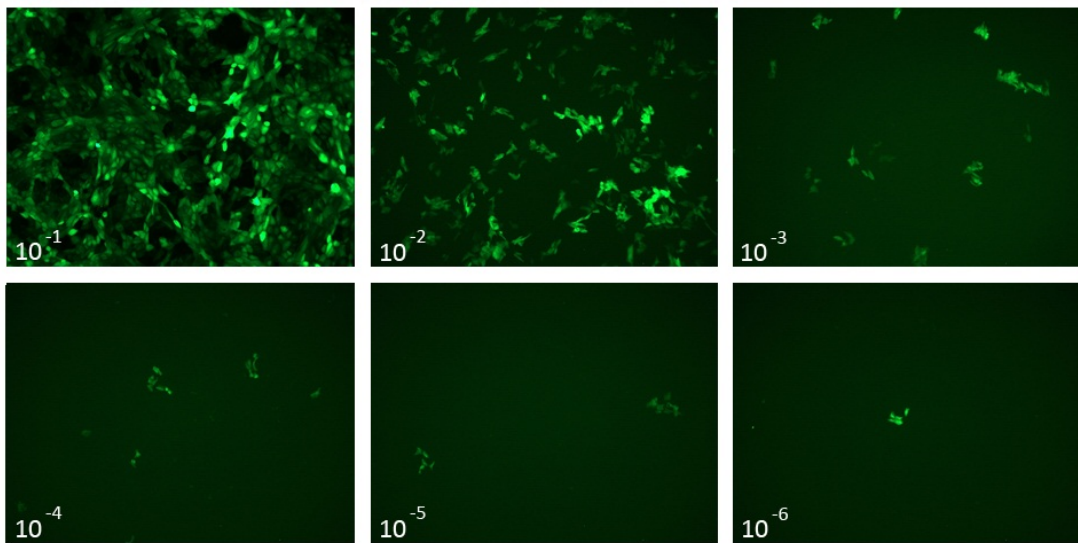


Abb. 4.46 | 293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit *pF6gW-L4* und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert

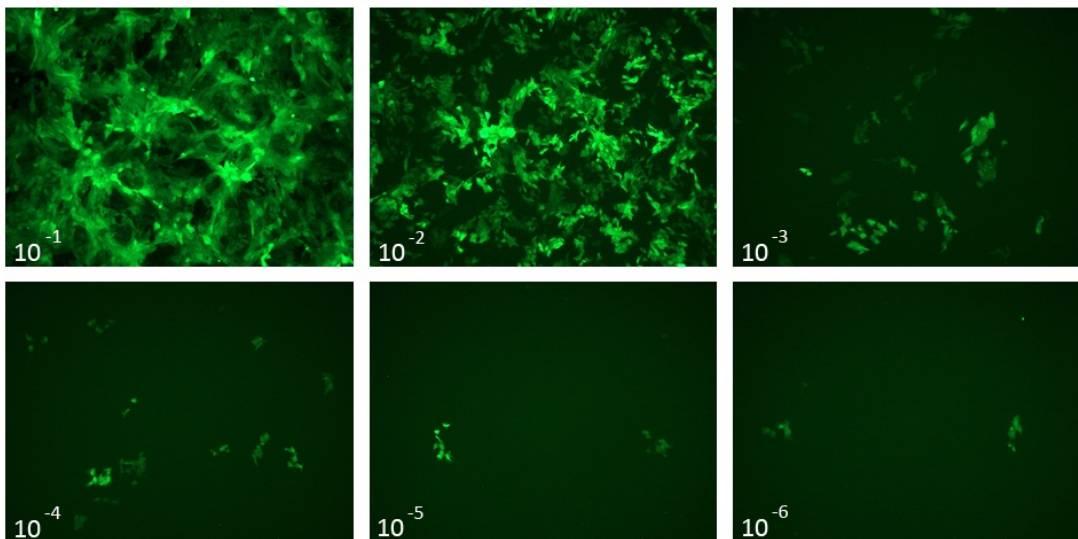


Abb. 4.47 | 293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit *pF6gW-M4* und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert

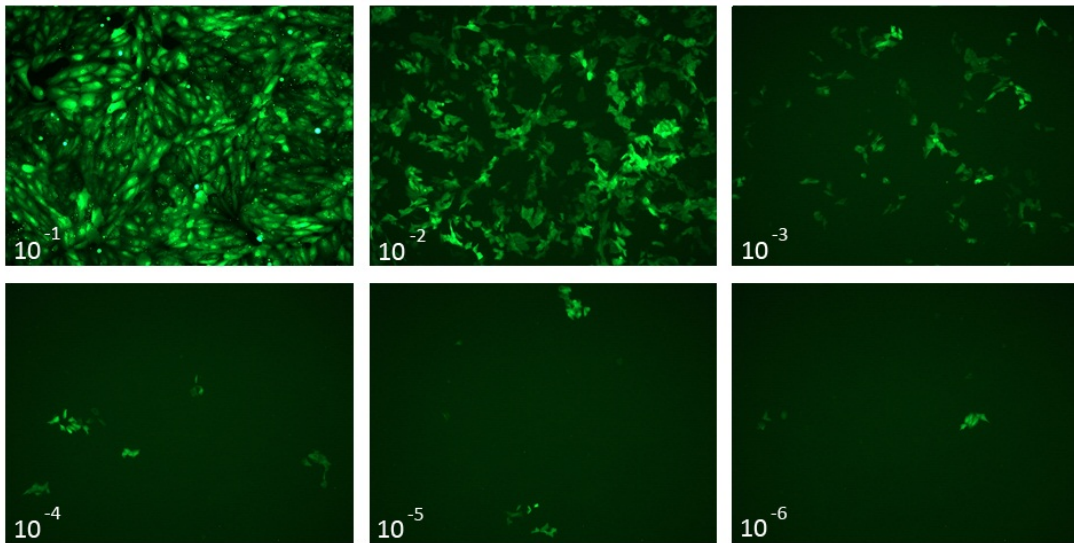


Abb. 4.48 | 293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypisierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit *pF6gW-N1* und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert

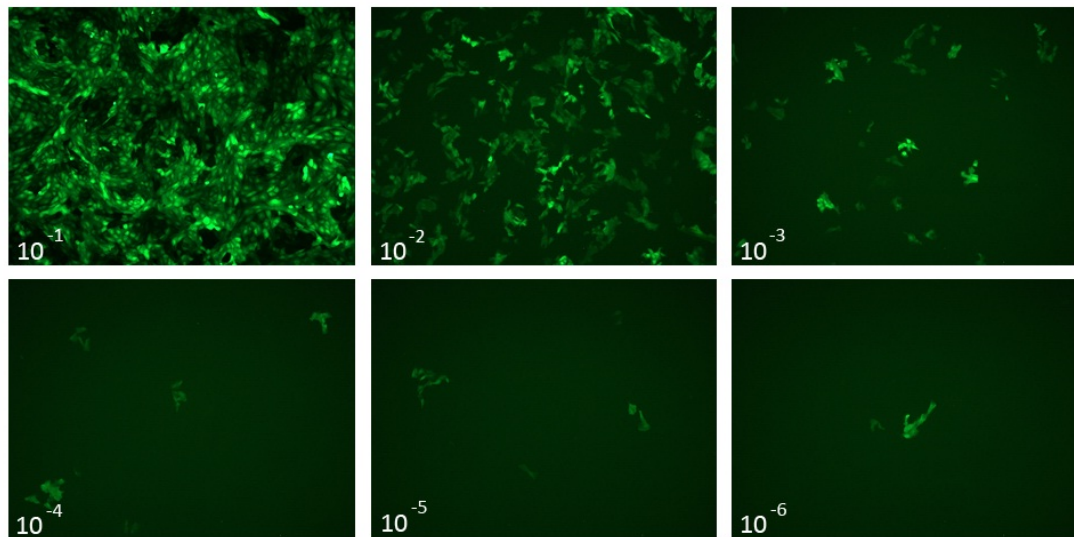


Abb. 4.49 | 293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypisierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit *pF6gW-P6* und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert

Die Abbildungen zeigen, dass jeder der erzeugten lentiviralen Partikel die Expression des Fluoreszenzproteins *eGFP* und somit der unterschiedlichen shRNAs in den behandelten Zellen bedingen kann.

Die Partikel wurden zwischenzeitlich zur Aufbewahrung bei -20°C tiefgefroren.

4.3.2.3 Test auf eine Inhibition der Virusreplikation in piNT2-Zellen mithilfe *shRNA*-transduzierender lentiviraler Partikel

Für diese Versuche wurden je 1×10^4 *piNT2-Zellen* in 6-well Platten ausgesät und mit 2 mL LB-Medium überdeckt. Es folgte die Inkubation dieser Zellen ÜN bei 37°C im Brutschrank. Tags darauf erfolgte die Zugabe der lentiviralen Partikel mit einer MOI von 1,0. Am Folgetag erfolgte ein Mediumwechsel. Wie bereits bekannt ist, haben *piNT2-Zellen* ihre Fähigkeit zur Synzytienbildung verloren, können jedoch mit nichtinfizierten Zellen wieder fusionieren und Riesenzellen bilden [213]. Um dies zu verhindern wurde dem Medium einer transduzierten Zellkulturreihe *FIP* zugegeben und mit *piNT2-Zellen* verglichen, denen *FIP* nicht beigefügt wurde. Die Zellen wurden zu unterschiedlichen Zeitpunkten nach der durchgeführten Transduktion (p.t.) mittels Durchflusszytometrie gemessen (6 Tage p.t., 9 Tage p.t., 12 Tage p.t., 15 Tage p.t. und 20 Tage p.t.) und auf die Intensität der durch *MVEntagCAMHeHCRred* ausgelösten Rotfluoreszenz untersucht. Zusätzlich erfolgte eine vergleichende Betrachtung gezählter Zellen der Gates *HCRred+/eGFP+* und *HCRred-/eGFP+*. (vgl. 4.2). Sollte es zu einer Abschwächung der Rotfluoreszenz kommen, weist dies auf einen erfolgreichen Knockdown der jeweiligen MV-Proteine und einer hierdurch ausgelösten Inhibition der viralen Replikation in vitro hin.

In den Abb. 4.53 und 4.54 sind die Fluoreszenzeigenschaften transduzierter *piNT2-Zellen* unter gleichzeitiger Behandlung mit *FIP* 6 und 12 Tage nach stattgehabter Transduktion abgebildet.

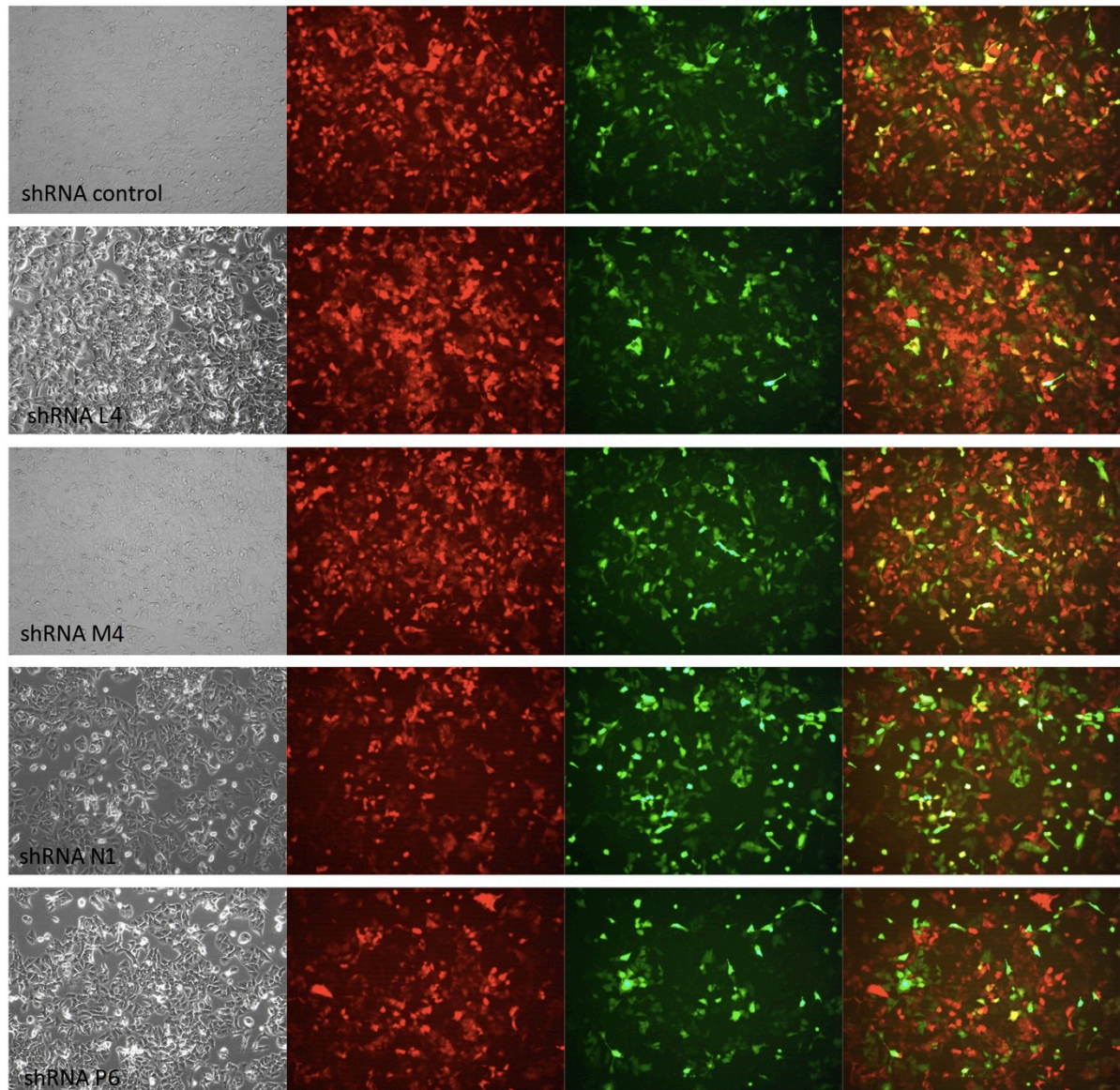


Abb. 4.50 | Aufnahme der transduzierten piNT2-Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop und anschließender Überlagerung des Rot- und Grünkanals 6 Tage nach erfolgter Transduktion

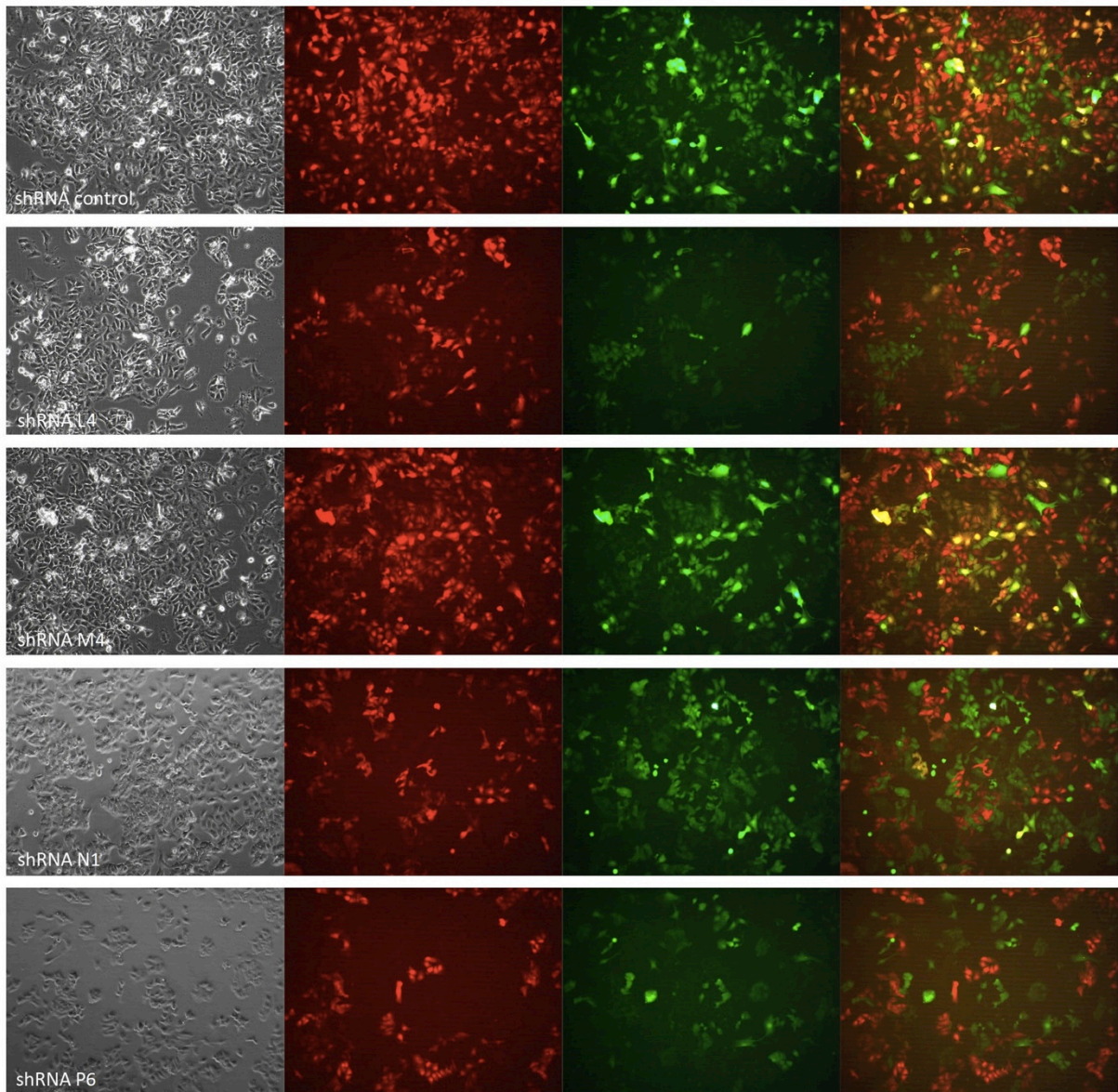


Abb. 4.51 | Aufnahme der transduzierten piNT2-Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop und anschließender Überlagerung des Rot- und Grünkanals 12 Tage nach erfolgter Transduktion

In der vergleichenden Betrachtung von Abb. 4.50 und 4.51 erkennt man 6 Tage nach der Transduktion der genetischen Information jeder der verschiedenen *shRNAs* mehrere Zellen nach farblicher Überlagerung des Rot- und Grünkanals in gelb- bzw. orangener Darstellung. Innerhalb dieser Zellen ist sowohl von einer viralen Replikation des Virus *MVEntagCAMHeHCRed* als auch der Expression der jeweiligen *shRNAs* auszugehen. Bei Verwendung der *shRNAs* *N1* und *P6* sind jedoch bereits vereinzelt Zellen zu erkennen die ausschließlich eine grüne oder

rote Fluoreszenz aufweisen. In diesen Zellen scheint bereits eine solch verminderte virale Replikationsrate stattzufinden, dass *HCRed* kaum noch exprimiert werden kann bei einer simultan bestehenden hohen *eGFP*-Expression.

Betrachtet man die Zellen in denselben wells sechs Tage später (12 Tage p.t.), weisen jene piNT2-Zellen mit einer Expression der *shRNA*-Konstrukte *P6*, *N1* und *L4* eine weitaus geringere Expression des Fluoreszenzproteins *HCRed*, erkennbar am quantitativen Überwiegen der grün fluoreszierenden Zellen, auf. Es findet eine farbliche Zweiteilung innerhalb der Zellkulturen in rot fluoreszierende oder ausschließlich grün fluoreszierende Zellen statt. Nur noch vereinzelt sind Zellen zu finden, die doppelt positiv bezüglich der Expression beider Fluoreszenzproteine *eGFP* und *HCRed* sind. Es ist davon auszugehen, dass in den meisten dieser Zellen die Synthese viraler Genprodukte vollständig zum Erliegen gekommen ist. In den Zellkulturen, welche die *Kontroll-shRNA* und *shRNA-M4* exprimieren finden sich dagegen weiterhin viele gelb/orange fluoreszierende Zellen. Hier ist weiterhin von einer viralen Replikation auszugehen, die auch während der Expression von *M4* und der *Kontroll-shRNA* noch möglich zu sein scheint.

Bezüglich der oben beschriebenen Auswertung der Fluoreszenzintensitäten wurden die Zellen mit ATV vom Plattenboden ihren 6-well-Platten 6, 9, 12, 15 und 20 Tage nach erfolgter Transduktion gelöst und einer durchflusszytometrischen Messung unterzogen. Die überzähligen Zellen wurden wieder in die jeweiligen wells einer frischen 6-well-Platte pipettiert und für die nächste Messung wiederverwendet. Dadurch konnten die Zellen eines Versuchsdurchganges, beginnend mit der Transduktion bis zum 20. Tag gemessen und beurteilt werden.

Eine zusammenfassende Darstellung aller Messungen mit und im Vergleich ohne vorheriger Zugabe von *FIP* ist der Abb. 4.52 zu entnehmen.

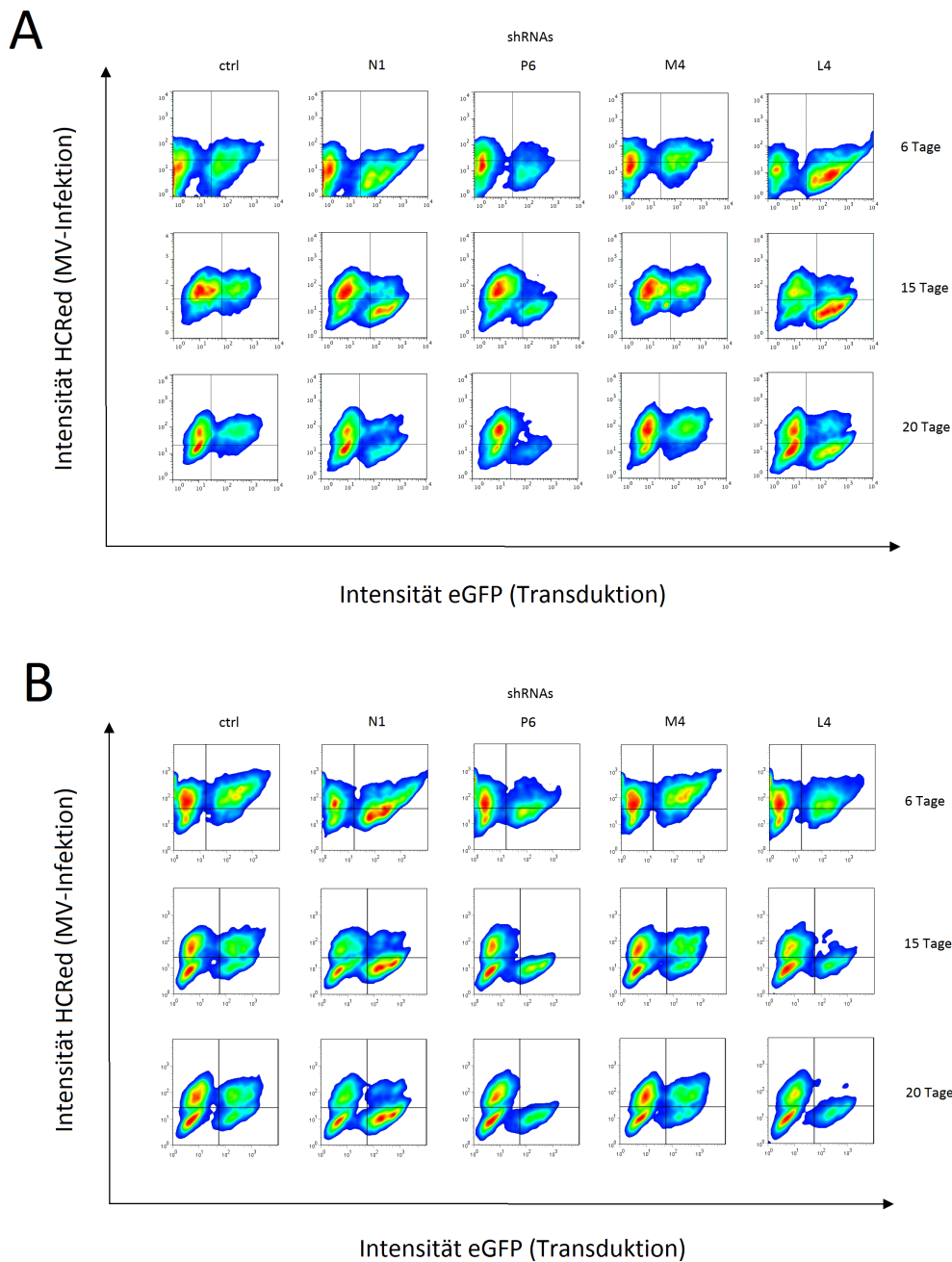


Abb. 4.52 | Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Auswertung der transduzierten piNT2-Zellen mit der Zugabe von *FIP* (A) und ohne *FIP* (B)

In Zeile 1 befinden sich die untersuchten Zellen des sechsten Tages nach erfolgter Transduktion, in Zeile 2 nach 15 Tagen und in Zeile 3 nach 20 Tagen. Die Intensität der Rotfluoreszenz ist auf der y-Achse und die der Grünfluoreszenz auf der x-Achse aufgetragen. Dementsprechend befinden sich analog zu Kapitel 4.2 im oberen rechten Quadranten *HCRed+/eGFP+*-Zellen, im unteren rechten Quadranten die *HCRed-/eGFP+*-Zellen, im unteren linken Quadranten die *HCRed-/eGFP--*-Zellen und im oberen linken Quadranten *HCRed+/eGFP--*-Zellen.

Nach erfolgter Transduktion der lentiviralen Partikel, welche die Expression der *Kontroll-shRNA* und der *shRNA-M4* bedingen, zeigt sich in den Zellkulturen mit sowie ohne *FIP* kein inhibitorischer Effekt auf die Expression von *HCRed*. Es verbleiben sehr viele der Zellen im *HCRed+/eGFP+*-Quadranten. *ShRNAs*, die gegen die viralen Proteine L, N und P gerichtet sind, zeigen jedoch mit oder ohne Zugabe von *FIP*, eine quantitative Umverteilung der Zellen im zeitlichen Verlauf vom *HCRed+/eGFP+* in den *HCRed-/eGFP+*-Quadranten. Insbesondere im Falle der *shRNA P6* findet sich keine nennenswerte Anzahl an Zellen innerhalb des *HCRed+/eGFP+*-Quadranten.

Um diese Effekte zu quantifizieren wurden zuerst die Zellen innerhalb der Gates *HCRed+/eGFP+* und *HCRed-/eGFP+* gemessen, welche nur piNT2-Zellen einschließen die auch tatsächlich transduziert wurden und auf ihre durchschnittliche Intensität des Fluoreszenzproteins *HCRed* untersucht. Im Falle einer Hemmung der viralen Replikation sollte in Zellen beider Gates ein Abfall der Rotfluoreszenzintensität überwiegen. Zu Vergleichszwecken wurde die durchschnittliche Rotfluoreszenz der *Kontroll-shRNA* mit 100% gleichgesetzt und die Werte aus den Messungen der Zellen, die die *shRNAs L4, M4, N1* und *P6* exprimieren, dazu in Verhältnis gesetzt.

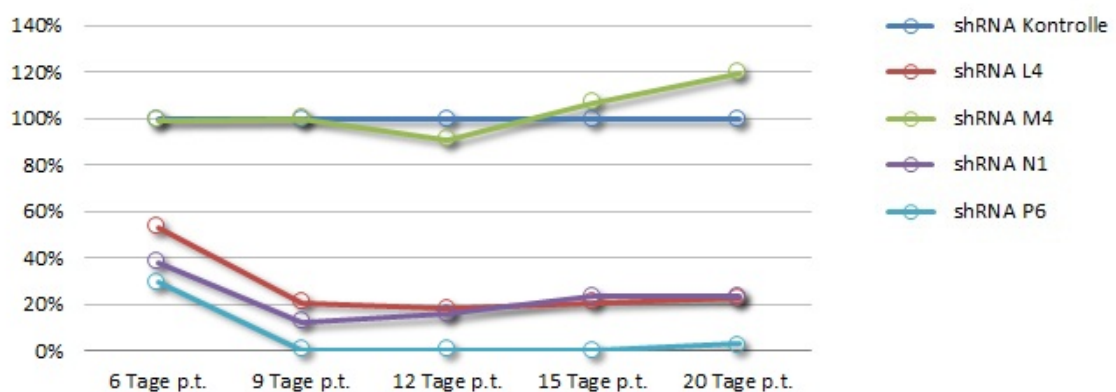


Abb 4.53 | Diagramm bezüglich der Auswertung der transduzierten lentiviralen Partikel in mit *FIP* behandelten piNT2-Zellen

Als Kontrolle dienen mit *Kontroll-shRNAs* transduzierte piNT2-Zellen, welche gleich 100% bezüglich ihrer Rotfluoreszenz über den zeitlichen Verlauf gesetzt wurden. Die einzelnen *shRNAs* sind farblich unterschiedlich markiert.

Zellen, die mit lentiviralen Partikeln transduziert wurden, die für die Expression der *Kontroll-shRNA* oder der *shRNA M4* bedingen, zeigen keinen Einfluss auf die Inhibition der Masernvirusreplikation. Die Intensität von *HCRed* scheint bei einer Expression der *shRNA-M4* ca. ab dem 15 Tag nach erfolgter Transduktion eher anzusteigen. Dagegen zeigen piNT2-Zellen, die *shRNAs L4, N1* und *P6* exprimieren, einen starken Abfall der Rotfluoreszenz und damit eine Inhibition der viralen Replikation. Die *shRNA L4* und *N1* zeigen am 9. Tag nach erfolgter Transduktion einen Abfall der durchschnittlichen Rotfluoreszenz im Vergleich zur *Kontroll-shRNA* von ca. 80%. Den stärksten Effekt scheint, wie bereits zuvor innerhalb der Auswertung des *RNAi*-Indikatorsystems, die *shRNA P6* zu haben. Die durchschnittliche Intensität der Rotfluoreszenz bewegt sich hier ab dem 9. Tag nach erfolgter Transduktion bei annähernd bei 0%, einer Inhibition der viralen Replikation von 100%.

Als weitere Form der Auswertung wurden die Zellen innerhalb des *HCRed+/eGFP+*-Bereiches im zeitlichen Verlauf gezählt. Zur Kontrolle dienten wiederum *piNT2HCRed-Zellen*, welche die *Kontroll-shRNA* exprimierten.

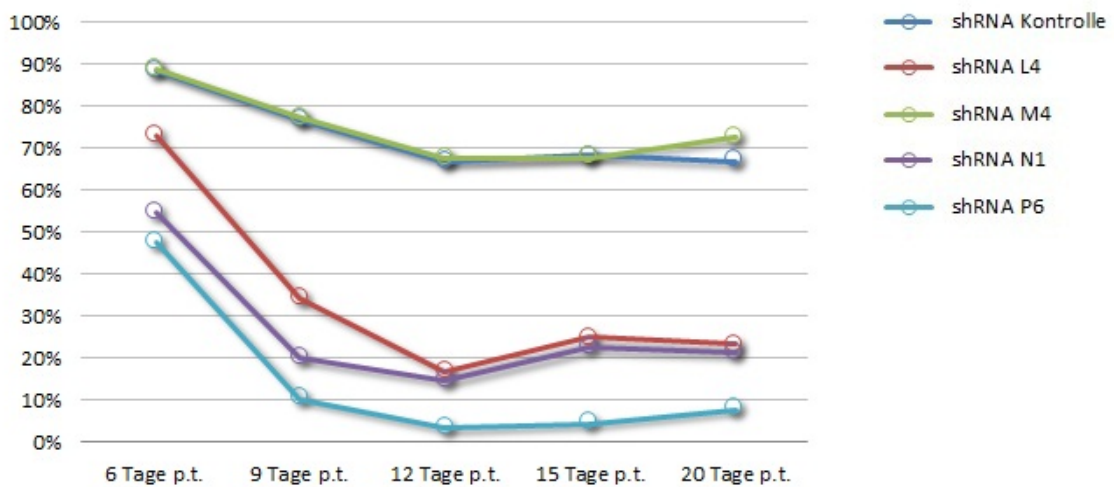


Abb. 4.54 | Anzahl der Zellen im $HCRed+/eGFP+$ -Bereich nach Transduktion der lentiviralen Partikel in mit *FIP* behandelte $piNT2$ -Zellen

Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen im $HCRed+/eGFP+$ -Quadranten aufgezeigt. Es ist die Anzahl der Zellen aufgetragen, die sich im $HCRed+/eGFP+$ -Quadranten befinden, verglichen mit der Gesamtzahl der gezählten Zellen aus den Quadranten $HCRed+/eGFP+$ und $HCRed-/eGFP+$ (100%).

Analog zu den Ergebnissen in Abb. 4.53 erkennt man eine Abnahme der $HCRed+/eGFP+$ -Zellen im Falle einer Expression der *shRNAs* *L4*, *N1*, *P6* im Vergleich zur *Kontroll-shRNA* und *shRNA M4*. Wiederum zeigte die *shRNA P6* den größten Effekt bezüglich einer viralen Replikationshemmung in Form der ausgeprägtesten Reduktion an $HCRed+/eGFP+$ -Zellen.

Die Auswertungen der $piNT2$ -Zellen, welche mit den lentiviralen Partikeln ohne die Zugabe von *FIP* behandelt wurden sind in den Abb. 4.55 und 4.56 dargestellt.

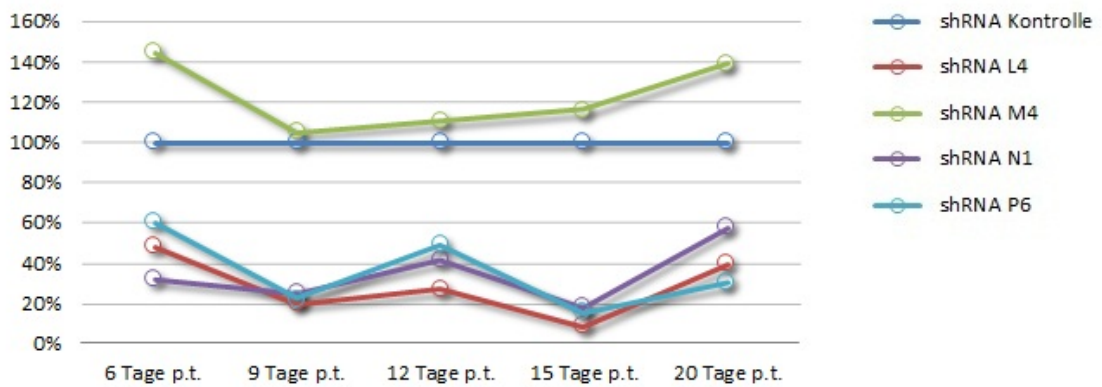


Abb. 4.55 | Diagramm bezüglich der Auswertung der transduzierten lentiviralen Partikel in piNT2-Zellen ohne die Behandlung mit FIP

Als Kontrolle dienen mit *Kontroll-shRNAs* transduzierte piNT2-Zellen, welche gleich 100% bezüglich ihrer Rotfluoreszenz über den zeitlichen Verlauf gesetzt wurden. Die einzelnen *shRNAs* sind farblich unterschiedlich markiert.

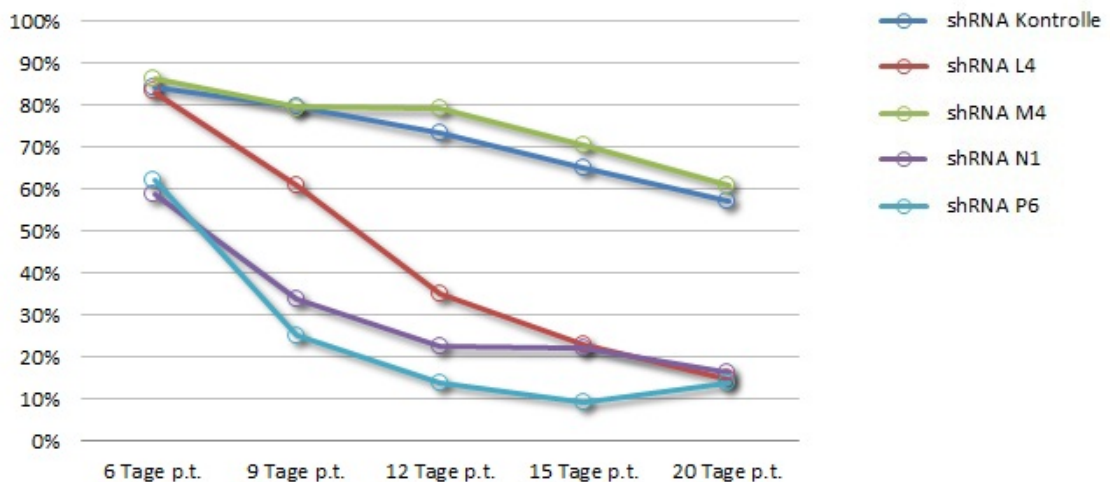


Abb. 4.56 | Anzahl der Zellen im HCRed+/eGFP+ - Bereich nach Transduktion der lentiviralen Partikel in nicht mit FIP behandelten piNT2-Zellen

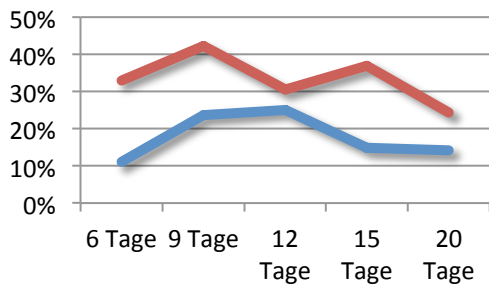
Auf der y-Achse ist die Anzahl der Zellen im *HCRed+/eGFP+* - Quadranten aufgezeigt. Es ist die Anzahl der Zellen aufgetragen, die sich im *HCRed+/eGFP+* - Quadranten befinden, verglichen mit der Gesamtzahl der gezählten Zellen aus den Quadranten *HCRed+/eGFP+* und *HCRed-/eGFP+* (100%).

Auch in den nicht mit *FIP* behandelten Zellen findet sich ein analoges Bild bezüglich der Abnahme der Rotfluoreszenz bei einer Expression der *shRNA L4, N1* und *P6* und dem damit verbundenen Knockdown der MV-Proteine wie in den mit *FIP* behandelten *piNT2-Zellen* (Abb. 4.53 und 4.54). Bei einer Expression der *shRNA M4* scheint es gleichfalls wieder zu einer Steigerung der viralen Replikation zu kommen (s. Abb. 4.55). Im Gegensatz zu der Verwendung von *FIP* zeigt die Verwendung der unterschiedlichen *shRNAs* kein klares Überwiegen in puncto Effektivität eines Knockdowns bei einer Verwendung der *shRNA P6*. So erreichen die *shRNAs L4* und *N1* einen ähnlich verminderten Wert bezüglich einer Abnahme der *HCRed+/eGFP+-Zellen* 20 Tagen nach Transduktion.

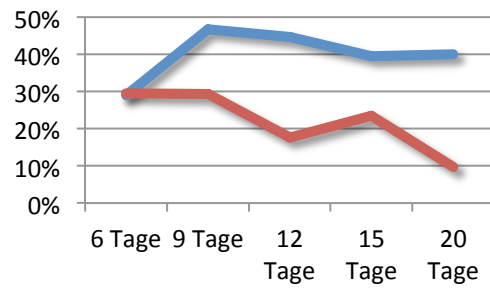
4.3.2.4 Vergleich des langfristigen Infektionsgeschehens *piNT2-Zellen* mit und ohne einer Zugabe von *FIP* in den Zellkulturen

Im Folgenden wurde untersucht, inwieweit es Unterschiede in der Anzahl der sich im *HCRed-/eGFP+-Quadranten* befindlichen Zellen und einer gleichzeitigen Behandlung mit *FIP* oder ohne *FIP* gibt. So wurden die *eGFP+-Zellen* (100 %) in 2 Gruppen unterteilt: *HCRed+* und *HCRed-*. Die *HCRed--Zellen* jeder der *shRNAs L4, M4, N1, P6* und *-ctrl* bei denen einerseits eine Behandlung mit *FIP* und andererseits ohne *FIP* stattfand, wurden gegeneinander aufgetragen.

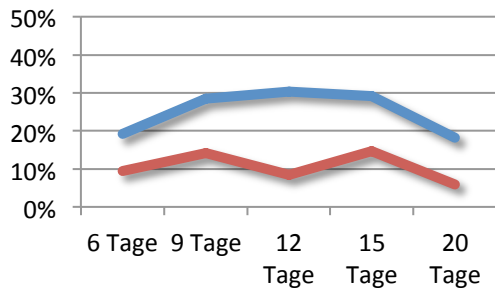
Das Ergebnis ist der Abbildung 4.57 zu entnehmen.



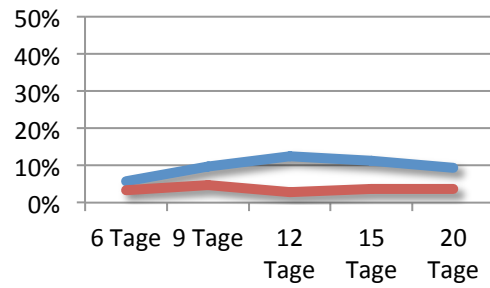
shRNA L4



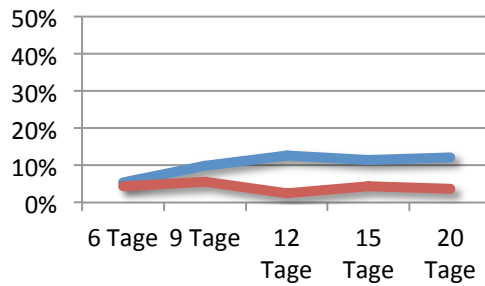
shRNA N1



shRNA P6



shRNA M4



Kontroll-shRNA

Abb. 4.57 | Vergleich des Prozentsatzes *HCRed-/eGFP+*-Zellen bezüglich einer Behandlung mit *FIP*

Die blau markierte Linie stellt die mit *FIP* behandelten Zellen dar. Die rote Linie stellt die nicht mit *FIP* behandelten Zellen dar. Auf der y-Achse ist der Prozentsatz der Zellen aufgetragen, welche sich im Quadranten der *HCRed-/eGFP+*-Zellen befinden.

Im Falle einer zeitgleichen Anwendung von *FIP* (außer bei einer Verwendung der *shRNA L4*) scheint die Anzahl an *HCRed-/eGFP+*-Zellen regelhaft zu überwiegen. Dieser Effekt ist auch bei jenen *shRNAs* zu beobachten, welche

nicht in die Hemmung der viralen Proteinbiosynthese einzugreifen scheinen (*shRNA-ctrl*, *-M4*). Dies bedeutet, dass verhältnismäßig mehr Zellen in einem von Virus befreiten Zustand verbleiben, als ohne die Verwendung von *FIP*.

Anhand dieser Beobachtung stellt sich die Frage, ob in den Zellkulturen die Synzytienbildung für die Aufrechterhaltung des Infektionsgeschehens eine tragende Rolle spielen könnte.

4.3.2.5 Kontrolle einer noch vorhandenen Infektiösität von transduzierten piNT2-Zellen mithilfe eines Overlay-Assays

Ausgehend von der Frage, ob die als „geheilt“ geltenden piNT2-Zellen (transduzierte piNT2-Zellen in denen keine Rotfluoreszenz nachgewiesen werden kann) noch die Fähigkeit besitzen umliegende noch nicht infizierte Nachbarzellen über die Ausbildung von Synzytien zu infizieren, wurde ein *Overlay-Assay* bzw. *Syncytium formation assay* durchgeführt. Hierbei wurde in 6-well-Platten eine entsprechende Anzahl an Vero-Zellen ausgesät. Sobald der Zellrasen ca. 90 % des Bodens bedeckte, wurde dieser mit piNT2-Zellen überdeckt. Die piNT2-Zellen entstammten einer Kultur, die 12 Tage zuvor mit den entsprechenden lentiviralen Partikeln behandelt und nach deren Transduktion es zu einer Expression der *shRNAs L4*, *N1* und *P6* gekommen war. Als Kontrolle dienten piNT2-Zellen ohne vorherige Zugabe lentiviraler Partikel.

Wie bereits beschrieben, verfügen mit MV infizierte Zellen über die Fähigkeit ihre Nachbarzellen durch Fusion mit daraus entstehender Synzytienbildung zu infizieren. Mittels dieses Versuches sollte nun überprüft werden ob die vormals als infiziert geltenden Zellen noch die Fähigkeit besitzen, weiterhin ihre Nachbarzellen infizieren zu können.

72 h nachdem die piNT2-Zellen dem Vero-Zellen bestehenden Zellrasen zugegeben wurden, erfolgte deren Auswertung anhand der Fluoreszenzmikroskopie. Die jeweiligen Aufnahmen sind der Abb. 4.58 zu entnehmen.

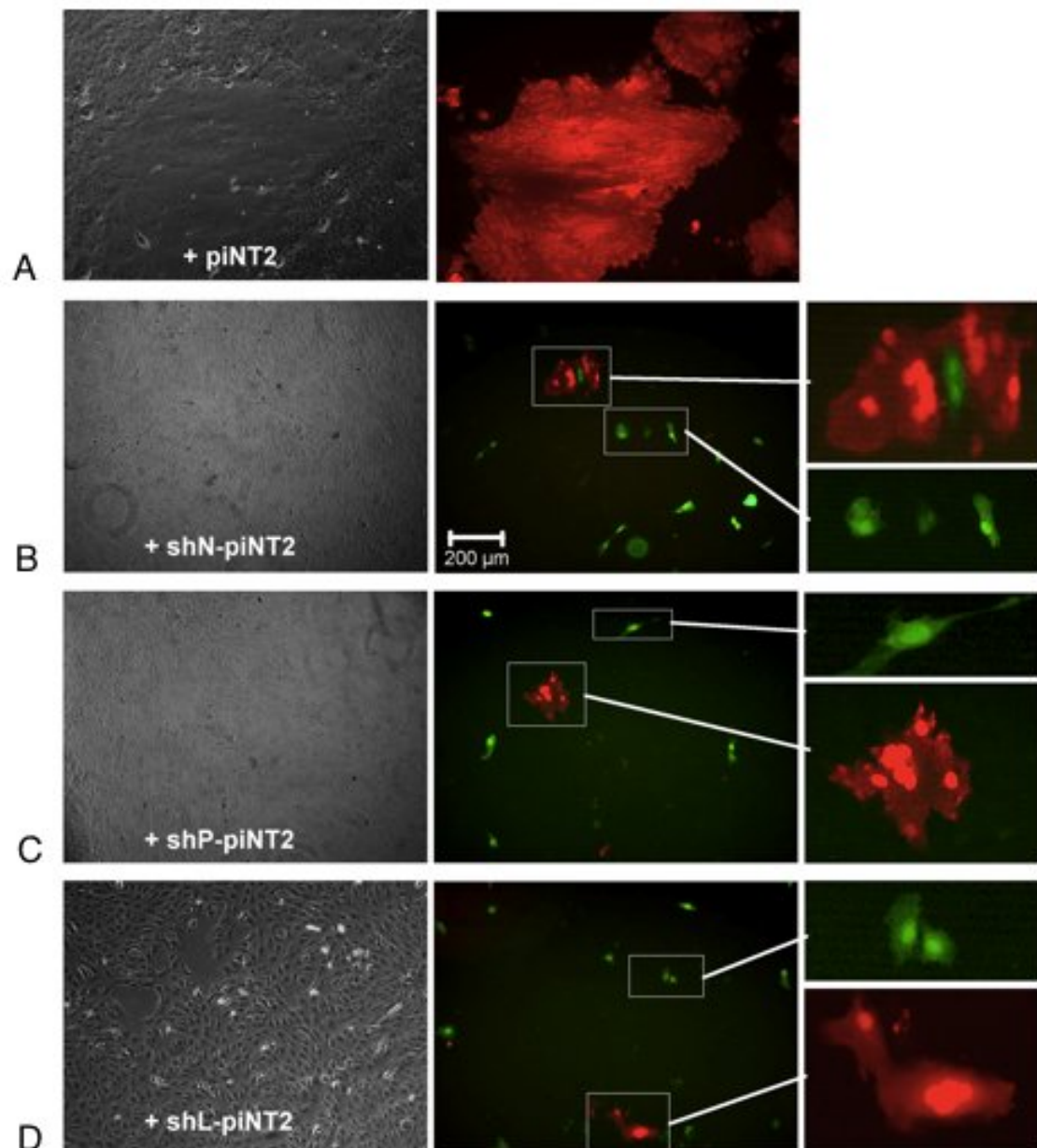


Abb. 4.58 | Overlay Assay mit einem aus Vero-Zellen bestehenden Zellrasen und darauf hinzugefügten vormals transduzierten piNT2-Zellen nach 72-stündiger Inkubation

A: Vero-Zellen + piNT2-Zellen (Kontrolle): Bildung großer Synzytien mit nicht-transduzierten NT2-Zellen; **B, C, D:** Vero-Zellen + die jeweilig zuvor transduzierten NT2-Zellen: Ausbleibende Synzytienbildung

Abb. 4.58 ist zu entnehmen, wie in der Kontrollgruppe (Vero-Zellen + piNT2-Zellen) eine Genese relativ großflächiger Synzytien stattfindet. Dagegen bleibt eine Synzytienbildung der vormals rot und nun ausschließlich grün fluoreszierenden piNT2-Zellen vollständig aus. Innerhalb desselben Versuches

vermögen es die noch rot fluoreszierende Zellen, entnommen aus derselben Zellkultur, auch mit den umliegenden Vero-Zellen Synzytien zu bilden bzw. eine allgemeine Vergrößerung ihres Umfangs zu bewirken.

Diese Beobachtung stützt die Vermutung einer vollständigen Elimination des Virus aus den vormals als infiziert geltenden piNT2-Zellen. Die nun grün fluoreszierenden Zellen scheinen vollständig ihre Fähigkeit einer Synzytienbildung bzw. Infektion ihrer Nachbarzellen verloren zu haben. Dies wird besonders deutlich in der Bildreihe B aus Abb. 4.58, in der es ein sich entwickelndes Synzytium nicht vermag eine in dessen Mitte liegende grün fluoreszierende Zelle in den syncytialen Zellverband aufzunehmen, was eine Art Immunität dieser Zellen bezüglich einer Reinfektion durch Zell-Zell-Kontakt besonders hervorhebt.

4.4 Entwicklung eines in vivo-Modells (Herstellung transgener Mäuse)

Ausgehend von den bisher gesammelten Ergebnissen in vitro sollten diese nun auf in vivo-Verhältnisse übertragen werden. Erster Schritt diesbezüglich wäre die Generierung transgener Mäuse, welche nach Transduktion durch das verwendete lentivirale System in ihren Körperzellen sowohl *shRNAs* gegen diverse Masernvirusproteine exprimieren, als auch einen Expressionsindikator.

4.4.1 Umklonierung der Vektoren *pF6gW-M4* und *-P6*

Die Grundstruktur des verwendeten lentiviralen Vektors *pF6gW* beinhaltet bekanntlich das Fluoreszenzprotein *eGFP*. Für die weiteren Versuche in einem Tiermodell wäre es von Vorteil, wenn es in deren Körperzellen nicht zu einer permanenten Expression des Proteins kommen würde, sondern diese gezielt durch Antikörper via Immunfluoreszenz anfärbbar wären. Hierzu eignet sich der Einsatz des Oberflächenmarkers bzw. Membranproteins *Thy 1.1*, auch bekannt als *CD90*. *Thy 1.1* ist ein N-glykolisiertes und über einen Glycophosphatidylinositolanker (*GPI-Anker*) an der Zellmembran verankertes Oberflächenprotein.

Nach in Abb. 4.59 dargestelltem Schema muss zunächst aus den Vektoren *pF6gW-M4* und *F6gW-P6* die Expressionskassette, welche *eGFP* enthält, ausgeschnitten und durch *Thy 1.1* aus dem Plasmid *pLL3.7-Thy1.1* ersetzt werden.

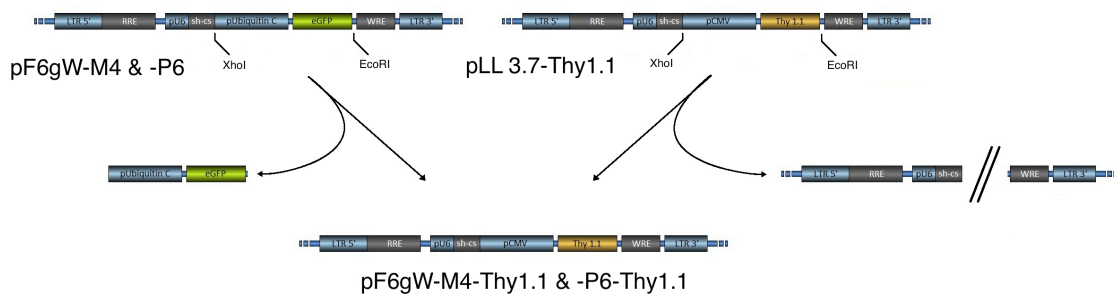


Abb. 4.59 | Schematische Darstellung der Umklonierung von *pF6gW* zu *pF6gW-Thy1.1*

Für die weiteren Versuche wurden *pF6gW-M4* und *-P6* ausgewählt, da sich beide Proteine aufgrund ihrer unterschiedlichen Effekte sehr gut vergleichen lassen bzw. transgene Tiere, welche die *shRNA M4* exprimieren als Kontrolle bezüglich der durch die *shRNA P6* hervorgerufenen Genknockdown fungieren könnte.

pF6gW-M4, *-P6* und *pLL3.7-Thy1.1* wurden im Folgenden mittels der Restriktionsendonukleasen *EcoRI* und *XhoI* nach in Kap. 3.3.5 beschriebenem Schema enzymatisch verdaut und anschließend gelelektrophoretisch aufgetrennt. Hierdurch konnte aus *pLL3.7-Thy1.1* die DNA des Oberflächenmarkers *Thy1.1* und die des Fluoreszenzproteins *eGFP* von den jeweiligen restlichen Teilen der Plasmide getrennt werden. Hierfür wurden aus dem Agarosegel nach Auftrennung das kleinere DNA-Fragment von *pLL3.7-Thy1.1* und die jeweils größeren Fragmente von *pF6gW-M4* und *-P6* aus dem Agarosegel ausgeschnitten und mit dem *QIAquick® Gel Extraction Kit*, nach in Kap. 3.3.3 beschriebenem Schema, extrahiert. Es folgte die Klonierung von *pF6gW-M4* und *-P6* mit dem *Thy1.1*-Fragment als Insert nach vorheriger Dephosphorylierung von *pF6gW-M4* und *-P6* mit *CIAP*. Das Produkt wurde danach einer Ethanol-fällung zugeführt.

Nach erfolgter Klonierung erfolgte ein Verdau mittels der Restriktionsenzyme *XhoI* und *EcoRI* (Abb. 4.60).

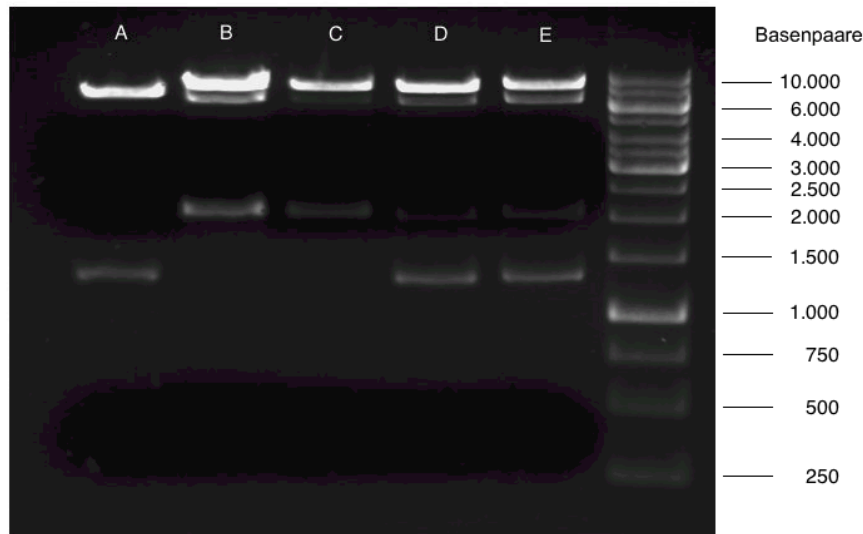


Abb. 4.60 | Verdau der Plasmide *pF6gW-Thy1.1-M4* bzw. *-P6* mit *EcoRI* und *XhoI*

A: *pLL3.7-Thy1.1*, **B:** *pF6gW-M4*, **C:** *pF6gW-P6*, **D:** *pF6gW-Thy1.1-M4*, **E:** *pF6gW-Thy1.1-P6*

Die Restriktionsenzyme *EcoRI* und *XhoI* führen im Rahmen des enzymatischen Verdau von *pLL3.7-Thy1.1* zu einer Isolierung eines die genetische Information für *Thy1.1* beinhaltenden DNA-Fragments und bei deren Anwendung bei *pF6gW-M4* und *-P6* zur Isolierung der genetischen Information für *eGFP*. Werden nun *pF6gW-Thy1.1-M4* und *-P6* dem Verdau zugeführt erkennt man ebenfalls eine Isolierung von des *Thy1.1* beinhaltenden DNA-Fragments im Zuge der elektrophoretischen Auftrennung. Somit ist bewiesen, dass sich die DNA, welche für das Protein *Thy1.1* kodiert, in den Plasmiden *pF6gW-Thy1.1-M4* und *-P6* befindet.

4.4.2 Herstellung lentiviraler Partikel aus *pF6gW-Thy1.1-M4* und *-P6*, Expressionsanalyse und Titration

Ausgehend von *pF6gW-Thy1.1-M4* und *-P6* erfolgte die Generierung lentiviraler Partikel mit in Kap. 3.4.3 beschriebenem Transfektionsschema mit sich anschließender Konzentrierung und Aufreinigung (Kap. 3.4.4).

Bezüglich der Kontrolle der Expression des Rezeptors *CD90 (Thy1.1)* auf den Zielzellen und einer Bestimmung des Titors wurde mit den generierten lentiviralen Partikeln eine Endpunkttitration (s. Kap. 3.4.8) durchgeführt. 24 h später wurden die Zellen mit dem Primärantikörper *Thy1.1-AK* und dem

Sekundärantikörper *Alexa 548* behandelt. Das anschließende fluoreszenzmikroskopische Bild der einzelnen Titrationsstufen ist den Abb. 4.61 und 4.62 zu entnehmen. Als Kontrolle wurden weder *pF6gW-Thy1.1-M4* noch *pF6gW-Thy1.1-P6* den Transfektionsansätzen zur Herstellung der lentiviralen Partikel zugefügt.

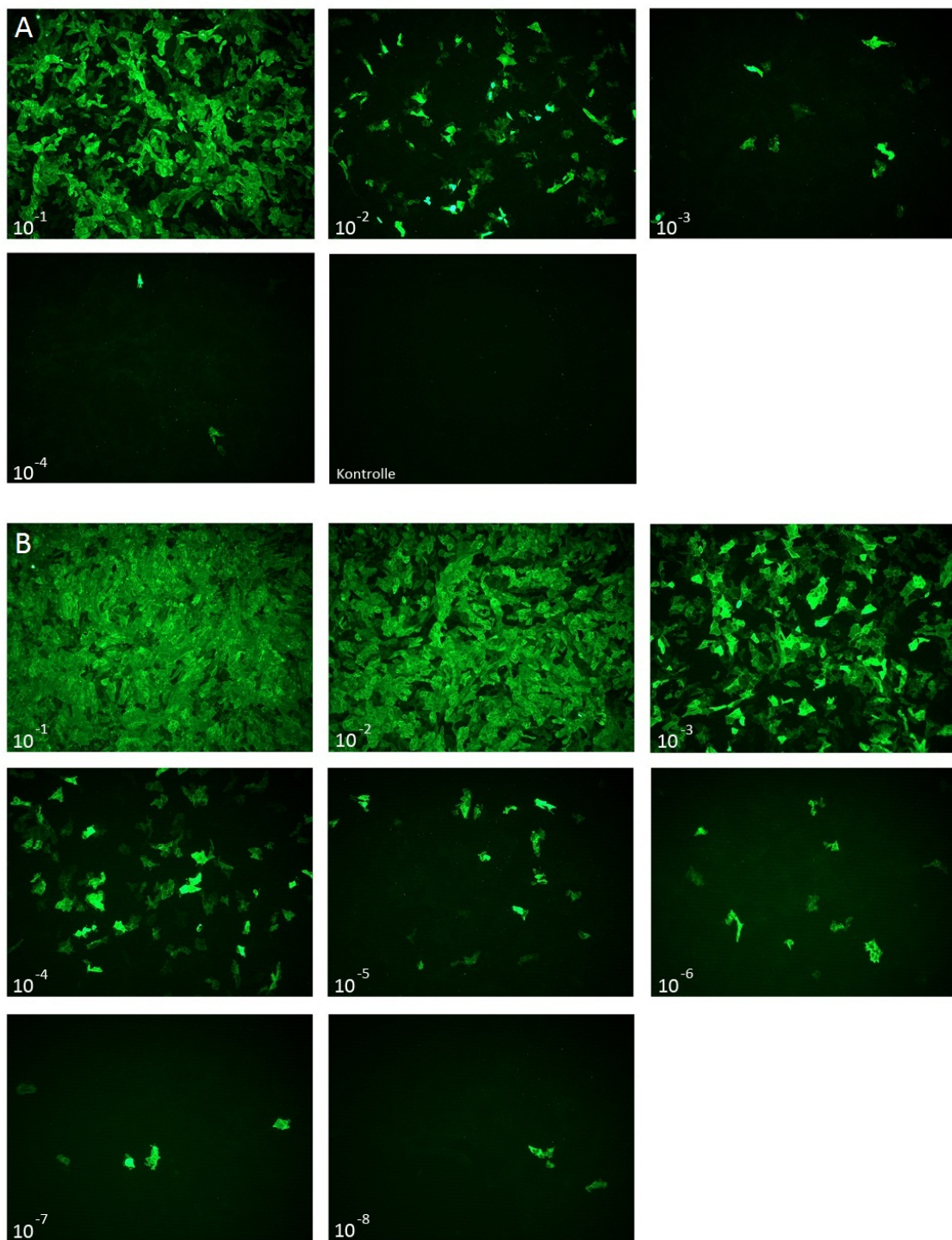


Abb. 4.61 | Fluoreszenzmikroskopisches Bild der Endpunkttitration der lentiviralen Partikel

Nachweis der Expression von *CD90* (*Thy1.1*) mittels des Primärantikörpers *Thy1.1-AK* und Sekundärantikörpers *Alexa 548* nachdem die lentiviralen Partikel ausgehend von *pF6gW-Thy1.1-M4* in 293T-Zellen transduziert wurden in den entsprechend angegebenen Titrationsstufen (A). Um den Titer zu steigern erfolgte anschließend die Ultrazentrifugation der VSV-G pseudotypierten lentiviralen Partikel (s. Kap. 3.4.4) und Immunfluoreszenzfärbung nach selbigem Schema nach erfolgter Transduktion (B).

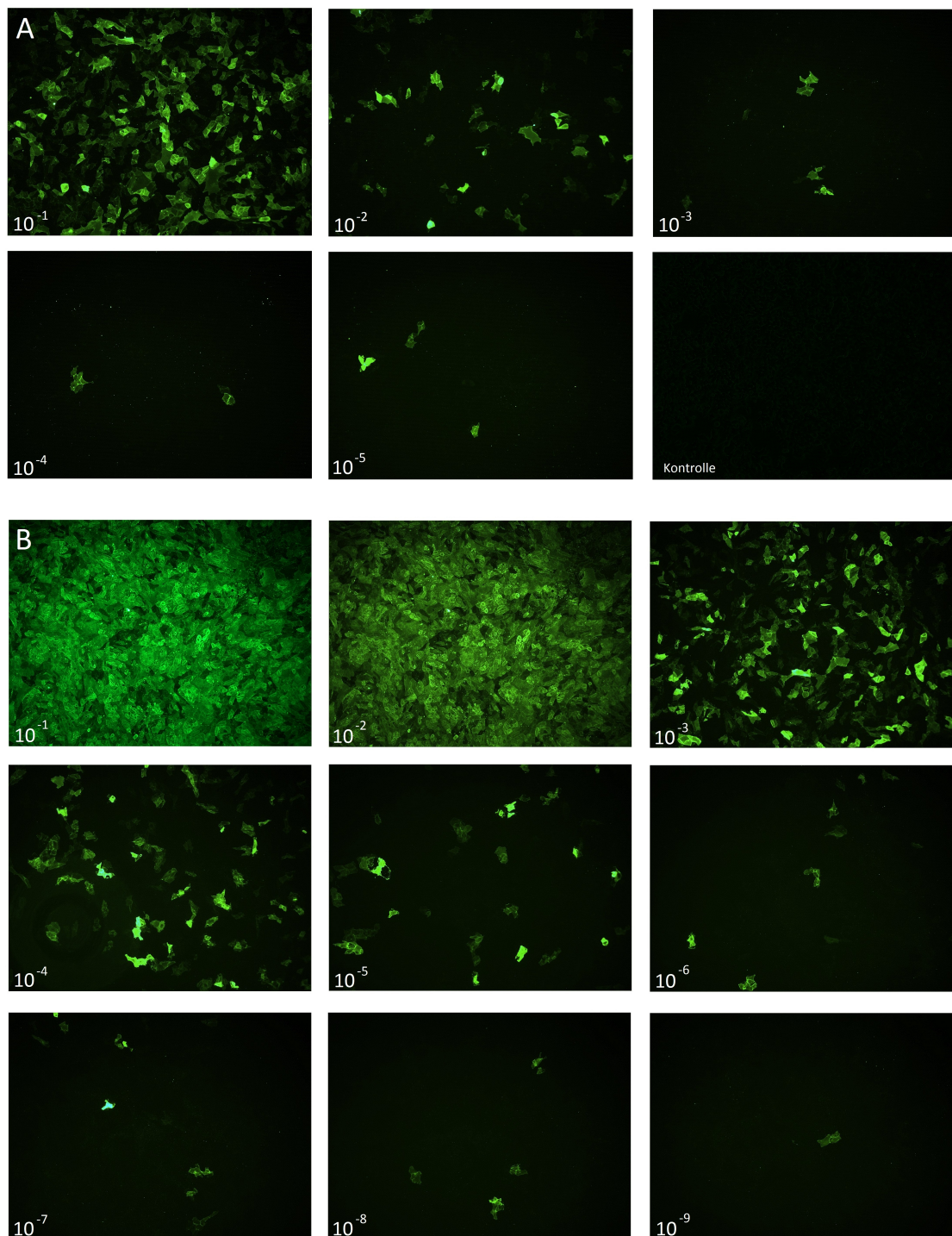


Abb. 4.62 | Fluoreszenzmikroskopisches Bild der Endpunkttitration der lentiviralen Partikel

Nachweis der Expression von *CD90* (*Thy1.1*) mittels des Primärantikörpers *Thy1.1-AK* und Sekundärantikörpers *Alexa 548* nachdem die lentiviralen Partikel ausgehend von *pF6gW-Thy1.1-P6* in 293T-Zellen transduziert wurden in den entsprechend angegebenen Titrationsstufen (A). Um den Titer zu steigern erfolgte anschließend die Ultrazentrifugation der VSV-G pseudotypierten lentiviralen Partikel (s. Kap. 3.4.4) und Immunfluoreszenzfärbung nach selbigem Schema nach erfolgter Transduktion (B).

Zellen, die nach Bindung von Primär- und Sekundärantikörper bei der Betrachtung mit dem Fluoreszenzmikroskop eine grüne Fluoreszenz annehmen exprimieren den Oberflächenmarker *CD90*. Somit kann in den zuvor transduzierten Zellen von einer simultanen Expression der jeweiligen *shRNA* ausgegangen werden.

Mit der Fertigstellung der lentiviralen Partikel ist es nun möglich mit der Generierung transgener Mäuse zu beginnen.

5. Diskussion

Eine Anwendung der *RNAi* bezüglich der Bekämpfung von viralen Infektionen wurde in den letzten Jahren bereits eingehend untersucht [200; 201]. Hierbei insbesondere Fragestellungen zu ihrer Anwendbarkeit bei manifesten Masernerkrankungen, besonders im Hinblick auf die durch sie hervorgerufenen neuronalen Infektionen bzw. Komplikationen, ausgelöst durch die Mechanismen einer *slow virus infection*. Hier schafft es das Immunsystem des betroffenen Wirtes trotz einer stark ausgeprägten humoralen Immunantwort nicht das Virus aus den betroffenen Zellen zu eliminieren. Die akuten Masern hingegen gelten bei immunkompetenten Erkrankten als selbstlimitierende Erkrankung, die in der Regel lediglich einer symptomatischen Therapie bedarf und so in den meisten Fällen folgenlos ausheilt. Ein gewisses Restrisiko bezüglich der Ausbildung einer SSPE besteht jedoch weiterhin. Hierfür existiert noch kein erfolgversprechender Therapieansatz und die durch das MV hervorgerufenen neurologischen Folgekomplikationen führen bisweilen unweigerlich zum Tode der Betroffenen. Insbesondere durch den Mangel an geeigneten Therapiemethoden könnte sich die *in vivo*-Anwendung der *RNAi* in Form eines möglichen neuen Therapeutikums bzw. Pharmakons als äußerst nutzbringend erweisen [214; 215; 216].

5.1 *SiRNA*-induzierte Hemmung der Masernvirusreplikation *in vitro*

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden wie mithilfe von *siRNAs*, welche gegen die Expression der Masernvirusproteine L, N und P gerichtet sind, sowohl akute als auch persistierende Infektionen erfolgreich gehemmt und in einem weiteren Schritt bereits infizierte Zellen von Viren befreit werden können. Wie bereits in Vorarbeiten beschrieben wurde, führt dagegen eine verminderte Expression des M-Proteins zu keiner Hemmung des viralen Replikationsvorganges, gleichzeitig jedoch zu einer erhöhten Rate an Zell-Zell-Fusionen und damit zu einer vermehrten Bildung von Synzytien. Ebenso führt dessen Inhibierung der Expression zu einer gesteigerten Synthese viraler mRNA und einer gesteigerten Vervielfältigung des MV-Genoms [42].

Eine Inhibierung der Expression des M-Proteins erscheint demnach als nicht praktikabel sogar eher kontraproduktiv, sofern eine Hemmung der

Virusreplikation erzielt werden soll. Auch in den im Rahmen dieser Dissertation durchgeführten Versuchen konnte der bereits zuvor postulierte Effekt einer verminderten Expression des M-Proteins im Rahmen der MV-Replikation beobachtet werden. Bei der Anwendung von *siRNAs* gegen die mRNA des M-Proteins in Zellkulturen die frisch infiziert wurden, führte dies im Rahmen der Untersuchungen zur Bildung von größeren Synzytien, sowie einer Zunahme der Virusreplikation in mit MV persistierend infizierten Zellkulturen. Obgleich dieser Effekt aus Vorarbeiten bekannt ist, weist er auf die Effektivität der verwendeten *siRNAs* hin, auch wenn die verwendete *siRNA*-Sequenz bei ihrer Anwendung innerhalb des plasmidorientierten Testsystems lediglich zu einer Minderung der M-Proteinexpression um ca. $\frac{1}{3}$ führte. In weiteren Untersuchungen könnten die lentiviralen Partikel, welche in den Zielzellen für eine Expression von *siRNAs* mit der mRNA des M-Proteins als target für Kontrollen eingesetzt werden oder uns helfen den Pathomechanismus zur Entstehung der *SSPE* zu klären. Virusisolate von an *SSPE* befallenen Patienten weisen regelmäßig Mutationen im Bereich des M-Proteins auf, welche nach Meinung vieler ursächlich für die Pathogenese sind [43].

Bezüglich der Auswahl eines möglichen Zielproteins sind somit insbesondere die Masernvirusproteine für einen möglichen Knockdown interessant, die Bestandteil des viralen *RNPs* sind. Die für dessen Bildung verantwortlichen Proteine sind das L-, N- und P-Protein. Bezüglich der Anwendung der *RNAi* gegen die Expression eines dieser Proteine sind vorab folgende Überlegungen möglich. Wie bereits beschrieben kommt es im Rahmen des Replikationszyklus der Masernviren zur Bildung eines Transkriptionsgradienten innerhalb des Genoms von 3'- in 5'-Richtung. Bezüglich der *RNP*-bildenden Proteine bedeutet dies, dass bezogen auf die in der Zelle vorherrschende mRNA-Menge die des N-Proteins quantitativ am höchsten ist, gefolgt von der mRNA des P-Proteins und mit insgesamt am wenigsten mRNA-Menge die des L-Proteins. Aufgrund dieser Überlegung erscheint der Knockdown des L-Proteins aufgrund der im Vergleich zum N- und P-Protein geringeren intrazellulär vorliegenden Menge an mRNA am ehesten praktikabel. Dagegen ist bekannt, dass es durch ein Verschieben des Leserasters innerhalb des P-Proteins im Zuge der Translation, sowie durch *RNA-Editing* zusätzlich zur Synthese und Expression der viralen

Nichtstrukturproteine C und V kommt. Ihre Rolle am Infektgeschehen ist die für den Wirt nachteilige Beeinflussung seiner angeborenen Immunantwort. Durch eine geeignete Auswahl von *siRNAs* könnten durch deren Translation bzw. intrazelluläres Einbringen zeitgleich die Expression von 3 verschiedenen Proteinen unterbunden und die Virusreplikation auf 2 verschiedenen Ebenen beeinflusst werden: Der Replikation des Virusgenoms bzw. der Synthese viraler Strukturproteine sowie der Beeinflussung der körpereigenen Immunabwehr durch die Hemmung der Synthese der Nichtstrukturproteine C und V. Anhand dieser theoretischen Überlegungen erscheint eine Minderung der Expression entweder des L- oder des P-Proteins bezüglich einer Hemmung der viralen Replikation am erfolgversprechendsten.

Im Zuge der Anwendung des lentiviralen Transduktionssystems in den untersuchten piNT2-Zellen konnte die virale Replikation innerhalb von 9 Tagen nach stattgehabter Transduktion der genetischen Information zur Bildung der *siRNAs* gegen die Expression der MV-Proteine L, N und P erfolgreich in den Zellen unterbunden werden. Im Falle der *siRNAs* gegen das L- und N-Protein führte deren intrazelluläre Translation zu einer nahezu vollständigen und im Falle von P zu einer vollständigen Elimination des Virus aus den zuvor persistierend infizierten NT2-Zellen. Auffällig ist auch die zeitlich parallel zueinander ablaufende Abnahme der durch das Virus ausgelösten Rotfluoreszenz in den behandelten Zellen. Die gewonnenen Ergebnisse vermitteln, dass ab dem 9. Tag nach erfolgter Transduktion, irrelevant welches der *RNP*-Proteine an deren Synthese gehemmt wird, eine weitere virale Replikation nicht mehr stattfinden könne und innerhalb dieses Zeitraumes eine Hemmung der viralen MV-Replikation maximal zu sein scheint. Dies lässt den Schluss zu, dass die korrekte Bildung des *RNPs*, auch mit mengenmäßig korrektem Verhältnis aller dafür nötigen Proteine, für die virale Replikation essentiell ist. Gründe bezüglich eines Verbleibens, auch nach 20-tägiger Inkubation von wenigen Zellen in denen eine Translation von *siRNAs* gegen mRNAs des L- und N-Proteins stattfand im *HcRed*-positiven Bereich, gleichbedeutend mit einer noch stattfindenden viralen Proteinbiosynthese, wenn die Effekte der *RNAi* ihr Maximum erreicht zu haben scheinen, sind bislang noch unklar. Mögliche Erklärungsmöglichkeiten könnten ein Mangel an Effektivität der

ausgewählten *siRNA*-Sequenzen sein, um einen vollständigen Knockdown zu erzeugen. So würde sowohl die virale Proteinbiosynthese als auch in der Folge die MV-Replikation weiterhin auf einem verminderten Niveau fortgeführt werden. Dies deckt sich mit den im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Resultaten innerhalb des zuvor angewandten Testsystems auf Plasmidbasis. Hier erzielte die eingesetzte *siRNA* gegen die mRNA des P-Proteins im Vergleich zu den *siRNAs* gegen das L- und N-Protein eine weitaus höhere Rate bezüglich eines Knockdowns. Überträgt man diese gewonnenen Erkenntnisse auf die Ergebnisse aus den Versuchen mit den persistierend infizierten Zelllinien, so kann man ausgehend von dieser Beobachtung von einer hohen Vorhersagekraft des Testsystems bezüglich einer Effektivität des Knockdowns sprechen. So fand sich auch bei der Anwendung der lentiviralen Partikel in den persistierend infizierten Zellkulturen eine weitaus höhere Knockdownrate bezüglich einer Expression des P-Proteins im Vergleich zu den MV-Proteinen L und N.

Ein weiterer Erklärungsversuch für eine geringere Rate der Expressionshemmung könnte eine quantitativ zu gering in der Zelle vorhandene Menge an transkribierten *siRNAs* sein. Ausgehend davon wäre es ebenso denkbar, dass bei der Anwendung der *RNAi* ein weiteres Fortbestehen der viralen Proteinbiosynthese auf niedrigerem Niveau möglich wäre und so die gebildeten *siRNAs* quantitativ nicht in der Lage sind die ständige Neubildung einer aktiven viralen Proteinbiosynthese weiterhin zu inhibieren.

Bezüglich der bereits angesprochenen Gradientenbildung bei der Synthese der viralen Proteine innerhalb des Vermehrungszykluses des MV lässt sich anhand der im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse keine Verbindung herstellen. Die Hemmung der Virusreplikation durch eine Minderung der Expression des N-Proteins, dessen genetische Information innerhalb des MV-Genoms am 5'-Ende liegt und dessen Menge an gebildeter mRNA quantitativ weitaus höher liegt als die des am 3'-Ende liegenden L-Proteins, konnte durch den *RNAi*-bedingten Genknockdown jeweils in gleichem Maß vermindert werden.

Betrachtet man die Fähigkeit der synthetisierten lentiviralen Partikel in persistierend infizierten Zellen einen Genknockdown bzw. eine virale Replikationshemmung zu erzielen, erkennt man, dass jene *siRNA*-Sequenzen,

welche zuvor mittels des vektorbasierenden Testsystems aufgrund ihrer hohen Knockdownrate selektiert wurden, ebenso zu einer außerordentlich großen Abnahme der viralen Replikation bzw. Abnahme von intrazellulär synthetisiertem Virus führten. Dies spricht für eine gute Vorhersagekraft des Plasmidtestsystems auf die untersuchten Infektionsvorgänge *in vitro*. Die Abnahme an fluoreszierendem intrazellulärem Virus bewegte sich hierbei von vollständig bis nahezu vollständig. Wenn es laut den vorliegenden Ergebnissen tatsächlich zu einer vollständigen Elimination des Virus aus den zuvor persistierend infizierten Zellen gekommen ist, kann man durchaus von einer „Heilung“ der vormals mit Viren befallenen Zellen sprechen. Insbesondere durch die nachfolgenden Ergebnisse, gewonnen aus dem *Overlay-Assay*, wird deutlich, wie es vormals als persistierend infizierte Zellen nicht mehr vermögen uninfizierte Nachbarzellen via Zell-Fusionen und nachfolgender Synzytienbildung zu infizieren. Ein weiteres Indiz für die „Heilung“ dieser Zellen von einer vormals bestehenden MV-Infektion.

Bezüglich des angesprochenen Verlustes der Fähigkeit von persistierend infizierten Zellen, die erfolgreich mit *siRNAs* gegen die Expression eines der viralen Proteine L, N und P behandelt wurden, im weiteren Verlauf uninfizierte Nachbarzellen zu infizieren ist es nötig bestimmte Rezeptoreigenschaften näher zu betrachten. Wie bereits beschrieben, besitzen mit MV infizierte Zellen via der Synthese des viralen F-Proteins die Fähigkeit über ihre Nachbarzellen die Infektion voranzutreiben sofern diese den Rezeptor *CD46* auf ihrer Oberfläche exprimieren. Zuvor piNT2-Zellen, die durch vorausgegangene Transduktionen *siRNAs* gegen die Proteine des *RNPs* synthetisieren, sind im Folgenden nicht mehr in der Lage mit den umliegenden Zellen in Kontakt zu treten um Synzytien zu bilden. Aus bereits durchgeführten Arbeiten auf diesem Gebiet wissen wir, dass in piNT2-Zellen ein stets konstantes Level bezüglich der viralen Replikation stattfindet, wohingegen virale Partikel nicht im Überstand nachzuweisen sind [213]. Persistierend infizierte Zellen scheinen ihre Nachbarzellen also nicht durch neugebildete infektiöse Partikel zu infizieren sondern durch die direkte Übertragung des Virus auf umliegende Nachbarzellen oder Zellteilungen mit der daraus resultierenden Weitergabe des intrazellulär vorkommenden Virus an die Filialgeneration. Die Besonderheit hierbei ist die Abwesenheit einer Bildung von Synzytien. Wenn solch

persistierend infizierte Zellen auf einen Zellkulturrasen mit nicht-infizierten Zellen aufgelegt werden, findet im Folgenden eine Fusion von nicht-infizierten Zellen mit bereits infizierten Zellen statt. In den im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Versuchen wurden piNT2-Zellen in zwei verschiedenen Versuchsreihen kultiviert. Einerseits in Anwesenheit und andererseits in Abwesenheit von *FIP*. Durch ein Unterbinden der Zellfusion mittels der Zugabe von *FIP* in Zellkulturen in denen piNT2-Zellen von MV via der Effekte der *RNAi* befreit wurden, verblieben verhältnismäßig mehr Zellen in einem als nicht-infiziert geltenden Status als piNT2-Zellen die nicht mit *FIP* behandelt wurden. Es scheint, dass für ein Aufrechterhalten bzw. eine Fortsetzung des Infektionsgeschehens die Zell-Fusionen eine entscheidende Rolle spielen. Jedoch lässt sich dieser in vitro beobachtete Zusammenhang nicht auf in vivo ablaufende Vorgänge innerhalb des ZNS übertragen. Zellen des ZNS sind postmitotisch, Zell-Fusionen werden hier nicht beobachtet und eine Expression viraler Hüllproteine ist durch andere Mechanismen reduziert. Zellen die nicht mit *FIP* behandelt wurden können demzufolge nach einer zuvor erreichten Elimination des Virus wiederinfiziert werden. Dies legt die Vermutung nahe, dass die ursprüngliche Verteilung bzw. Reorganisation des Rezeptors *CD46* in diesen Zellen wiedererlangt wird und so Wiederinfektionen durch den Kontakt mit umliegenden bereits infizierten Zellen möglich sind.

Mit den durchgeführten in vitro-Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass die Anwendung der *RNAi* zur Bekämpfung der *SSPE* oder ausgehend hiervon auch von anderen viral bedingten persistierenden Infektionen durch ihre enorm hohe antivirale Eigenschaft eine therapeutische Option darstellt. Für eine praktikable Anwendung müsste ihr Einsatz in in vivo-Testsystemen noch eingehender diskutiert bzw. erforscht werden.

5.2 Applikation von *siRNAs* als Therapeutikum in vivo

Im gezielten Ausschalten einzelner Gene im Zuge der Bekämpfung von viralen Infektionskrankheiten durch die Effekte der *RNAi* steckt ein enormes Potential. Bezüglich der Maserninfektion konnte gezeigt werden, wie wichtig die vollständige virale Proteinbiosynthese mit der korrekten quantitativen Synthese aller für das

MV essentiellen Proteine ist. Die Anwendung als Pharmakon erscheint relativ simpel, wenn man sich überlegt, dass lediglich ca. 20 nt lange RNA-Stränge in eine infizierte Zelle verbracht werden müssen. Jedoch ist dies das wohl derzeit größte noch zu lösende Problem, wenn es um eine praktikable Anwendung der *RNAi* bezüglich der Therapie von Infektionskrankheiten geht.

Bereits in Kap. 1.3.2 wurde bereits kurz auf die allgemeinen Probleme in der Anwendung bzw. dem Verbringen der *siRNA*-Moleküle an ihren eigentlichen Zielort eingegangen, wie etwa dem schnellen Abbau in vivo durch körpereigene Exo- und Endonukleasen [217]. Ebenso stehen mittlerweile die Anwendung verschiedener Überträgersysteme zur Verfügung: Liposomen [194], kationische Polymere [218], Viren [219], allgemeine chemische Modifikationen nackter *siRNAs* [220], Elektroporation [221] oder Exosomen [222].

Insbesondere im Rahmen der Bekämpfung der *SSPE* oder möglicherweise folgender Versuche im Tiermodell erscheint die bislang praktikabelste Anwendung darin zu liegen, *siRNAs* direkt an ihren Wirkort zu injizieren, wie etwa durch direkt intracerebrale Injektionen oder Injektionen in das Ventrikelsystem des Wirtes. Die bisher durchgeführten Untersuchungen diesbezüglich zeigten als nachteiligen Effekt auf, dass lediglich die nahe an der Injektionsstelle liegenden Zellen einen adäquaten Effekt bezüglich des gewünschten Knockdowns aufweisen konnten. Weiter entfernt liegende Bereiche blieben hiervon unbeeinflusst [223; 224; 225; 226]. Ebenso zeigten die eingesetzten Transfektionsreagenzien teilweise toxische Effekte im Bereich der Injektionsstellen sowie teilweise eine Auslösung einer Immunantwort [227; 228; 229]. In den letzten Jahren getätigte Bemühungen Transfektionsreagenzien diesbezüglich zu optimieren sind zwar teilweise erfolgreich, jedoch noch längst nicht ausgereift [230].

Wie wichtig ein sequenzspezifisches Design zwischen *siRNA* und zugehöriger mRNA bezüglich einer hohen Knockoutrate ist, wurde in den durchgeführten Untersuchungen deutlich. Im Falle einer therapeutischen Anwendung in vivo ist es durchaus denkbar, obwohl das Masernvirus per se als ein Virus mit hoher genetischer Stabilität anzusehen ist [231], dass sich das Genom des krankheitsauslösenden Masernvirus von Fall zu Fall in einem von *SSPE* befallenen Gehirn unterscheidet. Aus vorangegangenen Untersuchungen wurden

bereits verschiedene Mutationen innerhalb des Maserngenoms aus gewonnenen Virusisolaten beschrieben [232]. Daher ist es von enormer Wichtigkeit die exakte genetische Sequenz des verantwortlichen MV zu kennen bevor *siRNA* oder *shRNA* exprimierende Vektoren in vivo therapeutisch angewendet werden sollten. Generell bieten sich für einen gewünschten Knockdown im Rahmen eines therapeutischen Einsatzes jene Sequenzen an, die innerhalb einer stark konservierten Region des MV-Genoms vorkommen. Betrachtet man die sequenzspezifische Anwendbarkeit zur Therapie bei RNA-Viren im Allgemeinen sollte zudem die relativ hohe Mutationsrate der viralen RNA-Polymerasen bedacht werden. Gerade bei RNA-Viren ist es möglich, dass diese dem Knockdown einzelner Gene im Zuge von Mutationen entgehen können und die angewendeten *siRNA*-Sequenzen an Wirksamkeit verlieren. Ein solcher Effekt wurde bereits mehrfach bei der Anwendung der *RNAi* zur Therapie anderer viraler Infektionskrankheiten beobachtet, wie etwa bei Versuchen mit dem Humanen Immundefizienz Virus (*HIV*) und dem Knockdown des viralen HIV-Proteins *Nef* [233] oder etwa dem Poliovirus [234]. Jedoch können auch durch die gleichzeitige Verwendung mehrerer *siRNAs* als eine Art *siRNA*-Pool, die simultan multiple Angriffspunkte auf den mRNA-Strängen der jeweiligen viralen Proteine haben die Generierung von nachfolgend resistenten Virusgenerationen erfolgreich verhindert werden [234]. Sollte es therapeutisch zu einer gleichzeitigen Anwendung mehrerer *siRNAs* kommen, wäre die Frage inwieweit man bei der Auswahl geeigneter Sequenzen auf eine 100%ige Übereinstimmung von *siRNA* und target-mRNA verzichten könnte, bzw. bereits vorhandene Mutationen innerhalb des Virusgenoms in gewissem Maße vernachlässigt werden können. Es ist bekannt, dass nicht vollständig zur jeweiligen mRNA passende *siRNAs*, ähnlich wie *microRNAs* und ihrer Rolle im Netzwerk der Genregulation, nicht zu einer Degradation des mRNA-Stranges führen, jedoch die Fähigkeit besitzen einen Translationsstopp des entsprechenden Proteins hervorzurufen und somit ebenfalls wirkungsvoll in die virale Proteinbiosynthese eingreifen können [188]. Bei der Anwendung mehrerer nicht völlig sequenzhomologischer *siRNAs* gegen eine mRNA eines viralen Proteins könnte ein durch sie hervorgerufener nicht-maximaler Effekt durch eine Addition mehrerer einen Translationsstopp

hervorrufenden *siRNAs* maskiert werden und dadurch trotzdem ein vollständige Translationshemmung erzielt werden. Vermutlich wird man bei therapeutischen Schritten jedoch ohnehin darauf angewiesen sein zumindest mehrere potente *siRNA*-Sequenzen, ähnlich wie bei der derzeit durchgeführten *hochaktiven antiretroviralen Therapie (HAART)*, in welcher mehrere für die virale Replikation verantwortliche Synthesebestandteile inhibiert werden, zu verwenden um die bereits angesprochene Generierung resistenter Mutanten zu unterbinden bzw. eine Therapie auf adäquatem Niveau gewährleisten zu können.

Der Gebrauch von lentiviralen Vektoren bzw. lentiviralen Partikeln in der therapeutischen Anwendung zur Bekämpfung der *SSPE* sollte in Zukunft weiter eingehend untersucht werden. Lentivirale Vektoren bzw. Partikel führen, nachdem ihre genetische Information in die Zielzellen verbracht wurde, zu einem wahllosen Einfügen dieser an einer beliebigen Stelle des menschlichen Genoms. Vorteil der Anwendung lentiviraler Transduktionssysteme ist sicherlich die langanhaltende Expression des eingebrachten genetischen Materials in den jeweiligen Zellen. Jedoch ist ebenso bekannt, dass dies zu einer Aktivierung von Onkogenen und damit zum Entstehen etwaiger Krebsleiden in postmitotischen Zellen führen kann [235, 236, 237, 238]. Zur weiteren Untersuchung dieses Problems wäre es nötig, die auf in vitro-Ebene gemachten Beobachtungen auf in vivo-Verhältnisse zu übertragen. Mit der Anwendung eines geeigneten Tiermodells könnte somit überprüft werden, inwieweit nachteilige Effekte auf den Gesamtorganismus beobachtet werden können oder ob eher von einem problemlosen Anwenden lentiviraler Transduktionssysteme auszugehen ist.

In einer 2007 fertiggestellten Publikation wurde ein rekombinantes Adenovirus generiert, welches die MV-Replikation durch die Expression von *siRNAs* gegen die mRNA des L-Proteins hemmen sollte [239]. Hierbei wurden Vero/SLAM-Zellen einerseits mit Virusisolaten eines klinischen Masernfalles (*K52*) und auf der anderen Seite mit Virusisolaten eines *SSPE*-Patienten infiziert (*Kobe-1*). Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigten, dass eine wirkungsvolle virale Replikationshemmung nur erzielt werden konnte wenn hohe MOI-Raten (30, 300, 3000) angewendet wurden. Außerdem konnte ein sehr viel größerer Effekt der *siRNAs* beobachtet werden, wenn die untersuchten Zellen vor ihrer MV-Infektion

mit den für die Expression etwaiger *siRNAs* verantwortlicher Adenoviren infiziert wurden. Anhand der in dieser Arbeit gemachten Erkenntnisse scheint es demnach ein Problem zu sein Replikationsvorgänge mittels *RNAi* in frisch mit MV infizierten Zellen zu hemmen. Im Gegensatz hierzu führte in der hier durchgeführten Arbeit die Anwendung der *siRNAs* sowohl bei akuten Infektionen zu einer Replikationshemmung als auch bei persistierend infizierten Zellen durch die Anwendung eines lentiviralen Vektorsystems zu einem langanhaltenden Knockdown und damit zu einer hochgradigen Minderung des Infektionsgeschehens. Es gilt diesbezüglich zu berücksichtigen, dass in unserem Fall der Effekt der *RNAi* bei akuten Infektionen nicht quantifiziert wurde wie in der o.g. Vergleichsstudie. Jedoch war eine Hemmung des Infektionsgeschehens anhand der verminderten Synzytiengröße sehr deutlich, sodass auch diesbezüglich von einer adäquaten Hemmung viraler Replikationsvorgänge auszugehen ist.

5.3 Ausblick

Mit dem Beweis einer überaus hohen Effektivität der *RNAi* zur Bekämpfung von persistierenden Infektionen durch Masernviren sollte in einem nächsten Schritt die Untersuchung von *siRNAs* in vivo weiterverfolgt werden. Die dafür nötigen Vorarbeiten für einen Einsatz der bereits untersuchten *siRNA*-Sequenzen wurden mit der Umklonierung des Vektors *pF6gW-M4* und *-P6* in *pF6gW-Thy1.1-M4* und *-P6*, sowie der Herstellung lentiviraler Partikel aus diesen in der vorliegenden Arbeit abgeschlossen.

In einem in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies entwickeltem Tiermodell kann eine persistierende Infektion des ZNS als Vorstufe einer *SSPE* in Nagern simuliert werden [240]. Als Grundlage wären in diesem Modell folgende Versuchsanordnungen möglich:

Zum einen wäre die Generierung transgener Mäuse denkbar, welche die nötigen *siRNAs* in ihren Körperzellen permanent exprimieren. In diesem Modell könnte untersucht werden, ob eine Etablierung einer akuten oder persistierenden Infektion mit MV innerhalb des ZNS überhaupt noch möglich ist, bzw. ob dadurch von einer Art Immunität des jeweiligen Individuums ausgegangen werden kann.

Zum anderen könnte nach erfolgter Ausbildung der persistierenden Infektion innerhalb des ZNS, der eigentlichen Simulation einer *SSPE*, mittels der ausgewählten *siRNA*-Sequenzen und der generierten lentiviralen Partikel versucht werden die Infektion mit Masernviren zu therapieren.

6. Zusammenfassung

Die *SSPE* ist eine demyelinisierende Erkrankung des ZNS. Ätiologisch liegt eine persistierende Infektion von Masernviren der Neuronen bzw. Gliazellen zugrunde. Bis heute gibt es keine spezifische Therapie und lediglich symptomatische Therapiemaßnahmen werden in deren Behandlung angewandt. Obwohl sich während des Krankheitsverlaufes eine ausgeprägte Immunantwort des natürlichen als auch adaptiven Immunsystems des Wirtes abspielt führt die Erkrankung unweigerlich zum Tode der Betroffenen. Eine Therapiemöglichkeit diesbezüglich könnten die Effekte der *RNAi* darstellen. Um geeignete Sequenzen für einen möglichen Genknockdown einzelner MV-Gene herauszufiltern, wurde ein plasmid-basierendes Testsystem entwickelt, das die mRNA des Fluoreszenzproteins *DsRed2* zusammen mit mRNA-Sequenzen einzelner MV-Gene exprimiert. Gegen diese MV-Gene wiederum wurden verschiedene *shRNAs* ausgewählt, welche mithilfe eines lentiviralen Vektorsystems exprimiert werden. Als Expressionsindikator findet in diesem lentiviralen Vektorsystem simultan die Expression von *eGFP* als statt. Die Auswertung dieses *Dual-Color-Systems* erfolgte im Folgenden mittels FACS-Analysen. Die wirksamsten *siRNA*-Sequenzen, ausgewählt durch eine hohe Abnahme der Rotfluoreszenz in den untersuchten Zellen, wurden für weitere Versuche selektiert. Die auf diese Weise ausgewählten *shRNA*-Sequenzen wurden in einem weiteren Schritt durch die Generierung lentiviraler Partikel in persistierend infizierten NT2-Zellen (*piNT2*), die das Fluoreszenzprotein *HcRed* als Infektionsindikator exprimieren, transduziert. Weitere durchflusszytometrische Messungen zeigten eine äußerst hohe Reduktion viraler Replikation innerhalb von 7 Tagen bis unterhalb der Detektionsgrenze sofern die *shRNAs* gegen die Expression der MV-Proteine N, P und L gerichtet waren. Die Anzahl der virus-negativen Zellen blieb im Folgenden bis zu 3 Wochen nach stattgehabter Transduktion konstant, sofern das *fusion-inhibiting-peptide* den Zellkulturen hinzugegeben wurde. Die transduzierten *piNT2*-Zellen, welche keine Expression von *HcRed* zeigten wurden auf Zellrasen bestehend aus Vero-Zellen

aufgetragen und führten im zeitlichen Verlauf zu keiner Fusion bzw. Synzytienbildung. Dieser Zusammenhang legt nahe, dass die transduzierten piNT2-Zellen die Fähigkeit einer Expression viraler Proteine verloren haben und eine „Heilung“ stattfinden kann, wenn die virale Proteinbiosynthese durch eine permanente Expression von *siRNAs*, wie beispielsweise durch lentivirale Vektorsysteme, gehemmt wird.

7. Literaturverzeichnis

1. **Büchen-Osmond C. (2003):** Taxonomy and Classification of Viruses; in: Manual of Clinical Microbiology, 8. Auflage, Band 2, Seite 1217-1226, ASM Press, Washington DC
2. **Modrow S. (2003):** Das Masernvirus in: Molekulare Virologie. Spektrum Verlag, 3. Aufl., 2003. Seite 284-228
3. **Griffin D.E. (2001):** Measles virus. Fields Virology. Knipe,D.M., Howley, P.M., Griffin, D.E., Lamb, R.A., Martin, M.A., Roizman, B. und Straus, S.E. (eds). Philadelphia, PA: Lippincott Williams and Wilkins, Seite 1401–1441.
4. **Schneider-Schaulies S. & ter Meulen V. (2009):** Kap. 22: Measles Virus; in: Principles and practice of clinical virology, 6. Auflage, Hrsg.: Zuckerman A.J., Banatvala J.E., Schoub B.D., Griffiths P.D., Mortimer P.; John Wiley & Sons Ltd., 2009, Seite 533–560.
5. **Meadeley C.R. (1973):** Virus Morphology, Churchill Livingstone, Edinburgh
6. **Parks C.L., Lerch R.A., Walpita P., Wang H.P., Sidhu M.S., Udem S.A. (2001):** Analysis of the noncoding regions of measles virus strains in the Edmonston vaccine lineage. J Virol. **75**: 921-933.
7. **Cattaneo R., Rebmann G., Baczko K., ter Meulen V., Billeter, M.A. (1987):** Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. Virology **160**: 523-526.
8. **Schneider-Schaulies S., Liebert U.G., Baczko K., ter Meulen V. (1990):** Restricted expression of measles virus in primary rat astroglial cells. Virology **177**: 802-806.
9. **Bellini W.J., Englund G., Rozenblatt S., Arnheiter H., Richardson C.D. (1985):** Measles virus P gene codes for two proteins. J Virol. **53**: 908-919.
10. **Cattaneo R., Kaelin K., Baczko K., Billeter M.A. (1989):** Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein. Cell **56**: 759-764.
11. **Takeuchi O. & Akira S. (2008):** MDA5/RIG-I and virus recognition. Curr. Opin. Immunol. **20**: 17–22.
12. **Ikegame S., Takeda M., Ohno S., Nakatsu Y., Nakanishi Y., Yanagi Y. (2010):** Both RIG-I and MDA5 RNA helicases contribute to the induction of

- alpha/beta interferon in measles virus-infected human cells. *J Virol.* **84**: 372-379.
13. **Randall R. E. & Goodbourn S. (2008)**: Interferons and viruses: an interplay between induction, signalling, antiviral responses and virus countermeasures. *J. Gen. Virol.* **89**: 1-47.
 14. **Palosaari H., Parisien J.P., Rodriguez J.J., Ulane C.M., Horvath C.M. (2003)**: STAT Protein Interference and Suppression of Cytokine Signal Transduction by Measles Virus V Protein. *J Virol.* 2003 **77**: 7635-7644.
 15. **Ohno S., Ono N., Takeda M., Takeuchi K., Yanagi Y. (2004)**: Dissection of measles virus V protein in relation to its ability to block alpha/beta interferon signal transduction. *J Gen Virol.* **85**: 2991-2999.
 16. **Nakatsu Y., Takeda M., Ohno S., Shirogane Y., Iwasaki M., Yanagi Y. (2008)**: Measles virus circumvents the host interferon response by different actions of the C and V proteins. *J Virol.* **82**: 8296-8306.
 17. **Nakatsu Y., Takeda M., Ohno S., Koga R. and Yanagi Y. (2006)**: Translational inhibition and increased interferon induction in cells infected with C protein-deficient measles virus. *J. Virol.* **80**: 11861-11867.
 18. **Karlin D., Longhi S., Receveur V., Canard B. (2002)**: The N-terminal domain of the phosphoprotein of morbilliviruses belongs to the natively unfolded class of proteins. *Virology* **296**: 251-262.
 19. **Karlin D., Ferron F., Canard B., Longhi S. (2003)**: Structural disorder and modular organization in Paramyxovirinae N and P. *J Gen Virol.* **84**: 3239-3252.
 20. **Horikami S.M., Smallwood S., Bankamp B., Moyer S.A. (1994)**: An amino-proximal domain of the L protein binds to the P protein in the measles virus RNA polymerase complex. *Virology.* **205**: 540-545.
 21. **Bourhis J.M. & Longhi S. (2007)**: Measles virus nucleoprotein: structural organization and functional role of the intrinsically disordered C-terminal domain. In: *Measles Virus Nucleoprotein* (Longhi, S., Ed.), Seite 1-35. Nova Publishers Inc., NY.
 22. **Horikami S. M. & Moyer S. A. (1995)**: Structure, transcription, and replication of measles virus. *Curr Top Microbiol Immunol* **191**, 35-50.
 23. **Houben K., Marion D., Tarbouriech N., Ruigrok R.W., Blanchard L. (2007)**: Interaction of the C-terminal domains of sendai virus N and P

- proteins: comparison of polymerase-nucleocapsid interactions within the paramyxovirus family. *J Virol.* **81**: 6807-6816.
24. **Diallo A., Barrett T., Barbron M., Meyer G., Lefèvre P.C. (1994):** Cloning of the nucleocapsid protein gene of peste-des-petits-ruminants virus: relationship to other morbilliviruses. *J Gen Virol.* **75**: 233-237.
 25. **Bankamp B., Horikami S. M., Thompson P. D., Huber M., Billeter M., Moyer S. A. (1996):** Domains of the measles virus N protein required for binding to P protein and self-assembly. *Virology* **216**: 272-277.
 26. **Karlin D., Longhi S., Canard B. (2002):** Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein results in an impaired self-association. *Virology* **302**: 420-432.
 27. **Fooks A.R., Stephenson J.R., Warnes A., Dowsett A.B., Rima B.K., Wilkinson G.W. (1993):** Measles virus nucleocapsid protein expressed in insect cells assembles into nucleocapsid-like structures. *J Gen Virol.* **74**: 1439-1444.
 28. **Longhi S., Receveur-Bréchet V., Karlin D., Johansson K., Darbon H., Bhella D., Yeo R., Finet S., Canard B. (2003):** The C-terminal domain of the measles virus nucleoprotein is intrinsically disordered and folds upon binding to the C-terminal moiety of the phosphoprotein. *J Biol Chem.* **278**: 18638-18648.
 29. **Zhang X., Glendening C., Linke H., Parks C.L., Brooks C., Udem S.A., Oglesbee M. (2002):** Identification and characterization of a regulatory domain on the carboxyl terminus of the measles virus nucleocapsid protein. *J Virol.* **76**: 8737-8746.
 30. **tenOever B.R., Servant M.J., Grandvaux N., Lin R., Hiscott J. (2002):** Recognition of the measles virus nucleocapsid as a mechanism of IRF-3 activation. *J Virol.* **76**: 3659-3669.
 31. **Marie J.C., Kehren J., Trescol-Biémont M.C., Evtashev A., Valentin H., Walzer T., Tedone R., Loveland B., Nicolas J.F., Roubourdin-Combe C., Horvat B. (2001):** Mechanism of measles virus-induced suppression of inflammatory immune responses. *Immunity.* **14**: 69-79.
 32. **Laine D., Trescol-Biémont M.C., Longhi S., Libeau G., Marie J.C., Vidalain P.O., Azocar O., Diallo A., Canard B., Roubourdin-Combe C., Valentin H. (2003):** Measles virus (MV) nucleoprotein binds to a novel cell surface receptor distinct from FcγRII via its C-terminal domain: role in MV-induced immunosuppression. *J Virol.* **77**: 11332-11346.

33. **Ravanel K., Castelle C., Defrance T., Wild T.F., Charron D., Lotteau V., Roubourdin-Combe C. (1997):** Measles virus nucleocapsid protein binds to FcγRII and inhibits human B cell antibody production. *J Exp Med.* **186:** 269-278.
34. **Servet-Delprat C., Vidalain P.O., Valentin H., Roubourdin-Combe C. (2003):** Measles virus and dendritic cell functions: how specific response cohabits with immunosuppression. *Curr Top Microbiol Immunol.* **276:** 103-123.
35. **Blumberg B.M., Crowley J.C., Silverman J.I., Menonna J., Cook S.D., Dowling P.C. (1988):** Measles virus L protein evidences elements of ancestral RNA polymerase. *Virology* **164:** 487-497.
36. **Bellini W.J., Englund G., Richardson C.D., Rozenblatt S., Lazzarini R.A. (1986):** Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences, and deduced amino acid sequences. *J Virol.* **58:** 408-416.
37. **Riedl P., Moll M., Klenk H.D., Maisner A. (2001):** Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting. *Virus Res.* **83:** 1-12.
38. **Cathomen T., Mrkic B., Spehner D., Drillien R., Naef R., Pavlovic J., Aguzzi J., Billeter M.A., Cattaneo R. (1998):** A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *EMBO J.* **17:** 3899–3908.
39. **Spielhofer P., Bachi T., Fehr T., Christiansen G., Cattaneo R., Kaelin K., Billeter M.A., Naim H.Y. (1998):** Chimeric measles viruses with a foreign envelope. *J. Virol.* **72:** 2150–2159.
40. **Cathomen T., Naim H.Y., Cattaneo R. (1998):** Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence. *J Virol.* **72:** 1224-1234.
41. **Moll M., Klenk H.D., Maisner A. (2002):** Importance of the cytoplasmic tails of the measles virus glycoproteins for fusogenic activity and the generation of recombinant measles viruses. *J Virol.* **76:** 7174-7186.
42. **Reuter T., Weissbrich B., Schneider-Schaulies S., Schneider-Schaulies J. (2006):** RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *J Virol.* **80:** 5951-5957.

43. **Suryanarayana K., Baczko K., ter Meulen V., Wagner R.R. (1994):** Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *J Virol.* **68:** 1532-1543.
44. **Garg R.K. (2008):** Subacute sclerosing panencephalitis. *J Neurol.* **255:** 1861-1871.
45. **Baczko K., Liebert U.G., Billeter M., Cattaneo R., Budka H., ter Meulen V. (1986):** Expression of defective measles virus genes in brain tissues of patients with subacute sclerosing panencephalitis. *J Virol.* **59:** 472-478.
46. **Tahara M., Takeda M., Yanagi Y. (2007):** Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion. *J Virol.* **81:** 6827-6836.
47. **Malvoisin E. & Wild F. (1993):** Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the haemagglutinin and fusion proteins. *J. Gen. Virol.* **74:** 2365–2372.
48. **Wild T. F., Malvoisin E., Buckland, R. (1991):** Measles virus: both the haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J Gen Virol* **72:**439-442.
49. **Bolt G., Pedersen I.R. (1998):** The role of subtilisin-like proprotein convertases for cleavage of the measles virus fusion glycoprotein in different cell types. *Virology* **252:** 387-398.
50. **Sato T.A., Kohama T., Sugiura A. (1988):** Intracellular processing of measles virus fusion protein. *Arch Virol.* **98:** 39-50.
51. **Russell C.J., Luque L.E. (2006):** The structural basis of paramyxovirus invasion. *Trends Microbiol.* **14:** 243-246.
52. **Naniche D, Varior-Krishnan G, Cervoni F, Wild TF, Rossi B, Rbourdin-Combe C, Gerlier D. (1993):** Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J Virol.* **67:** 6025-6032.
53. **Liszewski M.K., Post T.W., Atkinson J.P. (1991):** Membrane cofactor protein (MCP or CD46): newest member of the regulators of complement activation gene cluster. *Annu Rev Immunol.* **9:** 431-455.

54. **Schneider-Schaulies J., Dunster L.M., Kobune F., Rima B., ter Meulen V. (1995):** Differential downregulation of CD46 by measles virus strains. *J Virol.* **69:** 7257-7259.
55. **Schnorr J.J., Dunster L.M., Nanan R., Schneider-Schaulies J., Schneider-Schaulies S., ter Meulen V. (1995):** Measles virus-induced downregulation of CD46 is associated with enhanced sensitivity to complement-mediated lysis of infected cells. *Eur J Immunol.* **25:** 976-984.
56. **Aversa G., Chang C.C., Carballido J.M., Cocks B.G., de Vries J.E. (1997):** Engagement of the signaling lymphocytic activation molecule (SLAM) on activated T cells results in IL-2-independent, cyclosporin A-sensitive T cell proliferation and IFN-gamma production. *J Immunol.* **158:** 4036-4044.
57. **Tatsuo H., Ono N., Tanaka K., Yanagi Y. (2000):** SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus. *Nature* **406:** 893–897.
58. **Erlenhoefer C., Wurzer W.J., Löffler S., Schneider-Schaulies S., ter Meulen V., Schneider-Schaulies J. (2001):** CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol.* **75:** 4499-4505.
59. **Browning M.B., Woodliff J.E., Konkol M.C., Pati N.T., Ghosh S., Truitt R.L., Johnson B.D. (2004):** T cell activation marker CD150 can be used to identify alloantigen-activated CD4+25+ regulatory T cells. *Cell Immunol.* **227:** 129–139.
60. **Andres O, Obojes K, Kim KS, ter Meulen V, Schneider-Schaulies J. (2003):** CD46- and CD150-independent endothelial cell infection with wild-type measles viruses. *J Gen Virol.* **84:** 1189-1197.
61. **Mühlebach M.D., Mateo M., Sinn P.L., Prüfer S., Uhlig K.M., Leonard V.H., Navaratnarajah C.K., Frenzke M., Wong X.X., Sawatsky B., Ramachandran S., McCray P.B. Jr., Cichutek K., von Messling V., Lopez M., Cattaneo R. (2011):** Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature.* **480:** 530-533.
62. **Noyce R.S., Bondre D.G., Ha M.N., Lin L.T., Sisson G., Tsao M.S., Richardson C.D. (2011):** Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus. *PLoS Pathog.* **7:** e1002240.

63. **Joshi S.B., Dutch R.E., Lamb R.A. (1998):** A core trimer of the paramyxovirus fusion protein: parallels to influenza virus hemagglutinin and HIV-1 gp41. *Virology*. **248**: 20-34.
64. **Samuel O. & Shai Y. (2001):** Participation of two fusion peptides in measles virus-induced membrane fusion: emerging similarity with other paramyxoviruses. *Biochemistry*. **40**: 1340-1349.
65. **Crowley J. C., Dowling P. C., Menonna J., Silverman J. I., Schuback D., Cook S. D., Blumberg B. M. (1988).** Sequence variability and function of measles virus 3' and 5' ends and intergenic regions. *Virology* **164**: 498-506.
66. **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.
67. **Banerjee, A. K. (1987):** The transcription complex of vesicular stomatitis virus. *Cell* **48**: 363-364.
68. **Plumet S., Duprex W.P., Gerlier D. (2005):** Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection. *J Virol*. **79**: 6900-6908.
69. **Runkler N., Pohl C., Schneider-Schaulies S., Klenk H.D., Maisner A. (2007):** Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein. *Cell Microbiol*. **9**: 1203-1214.
70. **Maisner A., Klenk H., Herrler G. (1998):** Polarized budding of measles virus is not determined by viral surface glycoproteins. *J Virol*. **72**: 5276-5278.
71. **Naim H.Y., Ehler E., Billeter M.A. (2000):** Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *EMBO J*. **19**: 3576-3585.
72. **Harrison M.S., Sakaguchi T., Schmitt A.P. (2010):** Paramyxovirus assembly and budding: building particles that transmit infections. *Int J Biochem Cell Biol*. **42**: 1416-1429.
73. **Blau D.M., Compans R.W. (1995):** Entry and release of measles virus are polarized in epithelial cells. *Virology*. **210**: 91-99.
74. **Dittmar S., Harms H., Runkler N., Maisner A., Kim K.S., Schneider-Schaulies J. (2008):** Measles virus-induced block of transendothelial

- migration of T lymphocytes and infection-mediated virus spread across endothelial cell barriers. *J Virol.* **82**: 11273-11282.
75. **Hof H. & Dörries R. (2005)**: Kap. 2.1.12 Paramyxoviridae, Morbillivirus, in: *Medizinische Mikrobiologie*, 3. Auflage, Thieme Verlag Stuttgart. Seite 216-219
76. **Lorenz D & Albrecht P. (1980)**: Susceptibility of tamarins (*Saguinus*) to measles virus. *Lab Anim Sci.* **30**: 661-665.
77. **Enders J.F. & Peebles T.C. (1954)**: Propagation in tissue cultures of cytopathogenic agents from patients with measles. *Proc Soc Exp Biol Med.* **86**: 277-286.
78. **Katz S.L., Enders J.F., Holloway A. (1962)**: The development and evaluation of an attenuated measles virus vaccine. *Am J Public Health Nations Health.* **52**: 5-10.
79. **Katz S.L. (2009)**: John F. Enders and measles virus vaccine--a reminiscence. *Curr Top Microbiol Immunol.* **329**: 3-11.
80. **World Health Organization/United Nations Children's Fund (WHO/UNICEF); Genf, Schweiz (2001)**: Global measles mortality reduction and regional elimination: strategic plan, 2001–2005 [WHO/V&B/01.13]. World Health Organization, 2001.
81. **Plempner R.K. & Snyder J.P. (2009)**: Measles control--can measles virus inhibitors make a difference? *Curr Opin Investig Drugs.* **10**: 811-820.
82. **World Health Organization (WHO); Genf, Schweiz (2011)**: Immunization surveillance, assessment and monitoring on Measles (http://www.who.int/immunization_monitoring/diseases/measles/en/index.html)
83. **Centers for Disease Control and Prevention (CDC) (2009)**: Global measles mortality, 2000-2008. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **58**: 1321-1326.
84. **Melnick J.L. (1996)**: Thermostability of poliovirus and measles vaccines. *Dev Biol Stand.* **87**: 155-160.
85. **Lin W.H., Griffin D.E., Rota P.A., Papania M., Cape S.P., Bennett D., Quinn B., Sievers R.E., Shermer C., Powell K., Adams R.J., Godin S., Winston S. (2011)**: Successful respiratory immunization with dry powder live-

attenuated measles virus vaccine in rhesus macaques. *Proc Natl Acad Sci USA* **108**: 2987-2992.

86. **World Health Organization (WHO); Genf, Schweiz (2010):** Resolution. Renewed commitment to elimination of measles and rubella and prevention of congenital rubella syndrome by 2010 and Sustained support for polio-free status in the WHO European Region. Moscow, Russia, WHO Regional Office for Europe; 2010. (http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0016/122236/RC60_eRes12.pdf.)
87. **Peltola H., Jokinen S., Paunio M., Hovi T., Davidkin I. (2008):** Measles, mumps, and rubella in Finland: 25 years of a nationwide elimination programme. *Lancet Infect Dis.* **8**: 796-803.
88. **Pervanidou D., Horefti E., Patrinos S., Lytras T., Triantafillou E., Mentis A., Bonovas S., Panagiotopoulos T. (2010):** Spotlight on measles 2010: ongoing measles outbreak in Greece, January-July 2010. *Euro Surveill.* **15**: 19629.
89. **Gee S., Cotter S., O'Flanagan D.; National Incident Management Team (2010):** Spotlight on measles 2010: measles outbreak in Ireland 2009-2010. *Euro Surveill.* **15**: 19500.
90. **Lernout T., Kissling E., Hutse V., De Schrijver K., Top G. (2009):** An outbreak of measles in orthodox Jewish communities in Antwerp, Belgium, 2007-2008: different reasons for accumulation of susceptibles. *Euro Surveill.* **14**: 19087.
91. **Noury U, Stoll J, Haeghebaert S, Antona D, Parent du Châtelet I; investigation team (2008):** Outbreak of measles in two private religious schools in Bourgogne and Nord-Pas-de-Calais regions of France, May-July 2008 (preliminary results). *Euro Surveill.* **13**: 18961.
92. **Wichmann O., Hellenbrand W., Sagebiel D., Santibanez S., Ahlemeyer G., Vogt G., Siedler A., van Treeck U. (2007):** Large measles outbreak at a German public school, 2006. *Pediatr Infect Dis J.* **26**: 782-786.
93. **Robert Koch Institut (2011):** RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten-Merkblätter für Ärzte. *Epidemiologischen Bulletin* 3/2011 vom 24. Januar 2011
94. **Esolen L.M., Ward B.J., Moench T.R., Griffin D.E. (1993):** Infection of monocytes during measles. *J Infect Dis.* **168**: 47-52.

95. **Hilleman M.R. (2001):** Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine*. **20**: 651– 665.
96. **Yanagi Y., Takeda M., Ohno S. (2006):** Measles virus: cellular receptors, tropism, and pathogenesis. *J Gen Virol* **87**: 2767–2779.
97. **McChesney M.B., Miller C.J., Rota P.A., Zhu Y.D., Antipa L., Lerche N.W., Ahmed R., Bellini W.J. (1997):** Experimental measles. I. Pathogenesis in the normal and the immunized host. *Virology*. **233**: 74-84.
98. **Sullivan J.L., Barry D.W., Lucas S.J., Albrecht P. (1975):** Measles infection of human mononuclear cells. I. Acute infection of peripheral blood lymphocytes and monocytes. *J Exp Med*. **142**: 773-784.
99. **de Swart R.L. (2008):** The pathogenesis of measles revisited. *Pediatr Infect Dis J*. **27**: 84-88.
100. **de Swart R.L., Ludlow M., de Witte L., Yanagi Y., van Amerongen G., McQuaid S., Yüksel S., Geijtenbeek T.B., Duprex W.P., Osterhaus A.D. (2007):** Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques. *PLoS Pathog*. **3**: e178
101. **Leonard V. H., Sinn P. L., Hodge G., Miest T., Devaux P., Oezguen N., Braun W., McCray P. B., McChesney M. B., Cattaneo R (2008):** Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest*. **118**: 2448–2458.
102. **Ludlow M., Rennick L.J., Sarlang S., Skibinski G., McQuaid S., Moore T., de Swart R.L., Duprex W.P. (2010):** Wild-type measles virus infection of primary epithelial cells occurs via the basolateral surface without syncytium formation or release of infectious virus. *J Gen Virol*. **91**: 971-979.
103. **Koletzko B. (2007):** Virale Infektionskrankheiten: Masern (Morbilli), in: *Kinder- und Jugendmedizin*, 13. Auflage, Hrsg. Koletzko B., Springer Medizin Verlag Heidelberg, 2007. Seite 205–208.
104. **Koplik H.T. (1896):** The diagnosis of the invasion of measles from a study of the exanthema as it appears on the buccal mucosa. *Arch Pediatr*. **13**: 918–922.
105. **Babbott F.L. & Gordon J.E. (1954):** Modern measles. *Am J Med Sci*. **228**: 334–361.

106. **Perry R.T. & Halsey N.A. (2004):** The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis.* **189**: 4-16.
107. **Zinkernagel R.M. & Hengartner H. (2004):** On immunity against infections and vaccines: credo 2004. *Scand J Immunol.* **60**: 9-13.
108. **Lievano F.A., Papania M.J., Helfand R.F., Harpaz R., Walls L., Katz R.S., Williams I., Villamarzo Y.S., Rota P.A., Bellini W.J. (2004):** Lack of evidence of measles virus shedding in people with inapparent measles virus infections. *J Infect Dis.* **189**: 165-170.
109. **Fulginiti V.A., Eller J.J., Downie A.W., Kempe C.H. (1967):** Altered reactivity to measles virus. Atypical measles in children previously immunized with inactivated measles virus vaccines. *JAMA* **202**: 1075-100.
110. **Nader P.R. (1968):** Atypical exanthem following exposure to natural measles: eleven cases in children previously inoculated with killed vaccine. *J Pediatr.* **72**: 22-28.
111. **Rauh L.W. & Schmidt R. (1965):** Measles Immunization with killed virus vaccine. Serum antibody titers and experience with exposure to Measles epidemic. *Am J Dis Child.* **109**: 232-237.
112. **Polack F.P., Auwaerter P.G., Lee S.H., Nousari H.C., Valsamakis A., Leiferman K.M., Diwan A., Adams R.J., Griffin D.E. (1999):** Production of atypical measles in rhesus macaques: evidence for disease mediated by immune complex formation and eosinophils in the presence of fusion-inhibiting antibody. *Nat Med.* **5**: 629-634.
113. **Polack F.P., Lee S.H., Permar S., Manyara E., Nousari H.G., Jeng Y., Mustafa F., Valsamakis A., Adams R.J., Robinson H.L., Griffin D.E. (2000):** Successful DNA immunization against measles: neutralizing antibody against either the hemagglutinin or fusion glycoprotein protects rhesus macaques without evidence of atypical measles. *Nat Med.* **6**: 776-781.
114. **Monif G.R. & Hood C.I. (1970):** Ileocolitis associated with measles (rubeola). *Am J Dis Child.* **120**: 245-247.
115. **Milles G. (1945):** Measles-pneumonia (with a note on the giant cells of measles). *Am J Clin Pathol* **15**: 334-338.
116. **Lucke B. (1918):** Postmortem findings in measles bronchopneumonia and other acute infections. *JAMA* **70**: 2006-2011.

117. **Herzberg M. (1932):** Giant cells in the lymphoid tissue of the appendix in the prodromal stage of measles: report of an isolated case. *JAMA* **98**: 139–140.
118. **Moussallem T.M., Guedes F., Fernandes E.R., Pagliari C., Lancellotti C.L., de Andrade H.F. Jr., Duarte M.I. (2007):** Lung involvement in childhood measles: severe immune dysfunction revealed by quantitative immunohistochemistry. *Hum Pathol.* **38**: 1239-1247.
119. **Okada H., Kobune F., Sato T.A., Kohama T., Takeuchi Y., Abe T., Takayama N., Tsuchiya T., Tashiro M. (2000):** Extensive lymphopenia due to apoptosis of uninfected lymphocytes in acute measles patients. *Arch Virol.* **145**: 905-920.
120. **Perry R.T. & Halsey N.A. (2004):** The clinical significance of measles: a review. *J Infect Dis.* **189**: 4-16.
121. **Vieth M, Dirshmid K, Oehler U, Helpap B, von Luckner AG, Stolte M. (2001):** Acute measles gastric infection. *Am J Surg Pathol.* **25**: 259-262.
122. **Stadlmann S., Lenggenhager D.M., Alves V.A., Nonogaki S., Kocher T.M., Schmid H.R., Singer G. (2011):** Histopathologic characteristics of the transitional stage of measles-associated appendicitis: case report and review of the literature. *Hum Pathol.* **42**: 285-290.
123. **Koster F.T., Curlin G.C., Aziz K.M., Haque A. (1981):** Synergistic impact of measles and diarrhoea on nutrition and mortality in Bangladesh. *Bull World Health Organ.* **59**: 901-908.
124. **Kayikçioğlu O., Kir E., Söyler M., Güler C., Irkeç M. (2000):** Ocular findings in a measles epidemic among young adults. *Ocul Immunol Inflamm.* **8**: 59-62.
125. **Foster A., Sommer A. (1986):** Childhood blindness from corneal ulceration in Africa: causes, prevention, and treatment. *Bull World Health Organ.* **64**: 619-623.
126. **Foster A., Sommer A. (1987):** Corneal ulceration, measles, and childhood blindness in Tanzania. *Br J Ophthalmol.* **71**: 331-343.
127. **Sindic C.J., Monteyne P., Laterre E.C. (1994):** The intrathecal synthesis of virus-specific oligoclonal IgG in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol.* **54**: 75–80.

128. **Brettschneider J., Tumani H., Kiechle U., Muche R., Richards G., Lehmsiek V., Ludolph A.C., Otto M. (2009):** IgG antibodies against measles, rubella, and varicella zoster virus predict conversion to multiple sclerosis in clinically isolated syndrome. *PLoS One.* **4:** 7638.
129. **Reiber H., Ungefehr S., Jacobi C. (1998):** The intrathecal, polyspecific and oligoclonal immune response in multiple sclerosis. *Mult Scler.* **4:** 111-117.
130. **Cook S.D., Blumberg B., Dowling P.C. (1986):** Potential role of paramyxoviruses in multiple sclerosis. *Neurol Clin.* **4:** 303-319.
131. **Ohara Y. (1999):** Multiple sclerosis and measles virus. *Jpn J Infect Dis.* **52:**198-200.
132. **Sips G.J., Chesik D., Glazenburg L., Wilschut J., De Keyser J., Wilczak N. (2007):** Involvement of morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease. *Rev Med Virol.* **17:** 223-244.
133. **Karosi T., Jókay I., Kónya J., Petkó M., Szabó L.Z., Sziklai I. (2007):** Expression of measles virus receptors in otosclerotic, non-otosclerotic and in normal stapes footplates. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* **264:** 607-613.
134. **Niedermeyer H.P., Gantumur T., Neubert W.J., Arnold W. (2007):** Measles virus and otosclerosis. *Adv Otorhinolaryngol.* **65:** 86-92.
135. **Weissbrich B., Schneider-Schaulies J., ter Meulen V. (2003):** Kapitel 18: Measles and its neurological complications, in: *Clinical Neurovirology.* Hrsg.: Nath A. und Berger J.R., Marcel Dekker Inc. New York, 2003
136. **Esolen L.M., Takahashi K., Johnson R.T., Vaisberg A., Moench T.R., Wesselingh S.L., Griffin D.E. (1995):** Brain endothelial cell infection in children with acute fatal measles. *J Clin Invest.* **96:** 2478-2481.
137. **Liebert U.G. (1997):** Measles virus infections of the central nervous system. *Intervirology.* **40:** 176-184.
138. **Reuter D. & Schneider-Schaulies J. (2010):** Measles virus infection of the CNS: human disease, animal models, and approaches to therapy. *Med Microbiol Immunol.* **199:** 261-271.
139. **Schneider-Schaulies J., ter Meulen V., Schneider-Schaulies S. (2003):** Measles infection of the central nervous system. *J Neurovirol.* **9:**247-252.
140. **Bellini W.J., Rota J.S., Lowe L.E., Katz R.S., Dyken P.R., Zaki S.R., Shieh W.J., Rota P.A. (2005):** Subacute sclerosing panencephalitis: more cases of

this fatal disease are prevented by measles immunization than was previously recognized. *J Infect Dis.* **192**: 1686-1693.

141. **Garg R.K. (2002)**: Subacute sclerosing panencephalitis. *Postgrad Med J.* **78**: 63-70.
142. **Vieker S., Schmitt J.J., Behrens C., Weissbrich B., Hartmann H. (2003)**: Subacute sclerosing panencephalitis in two brothers. *Neuropediatrics.* **34**: 326-329.
143. **Sharma V., Gupta V.B., Eisenhut M. (2008)**: Familial subacute sclerosing panencephalitis associated with short latency. *Pediatr Neurol.* **38**: 215-217.
144. **Dyken P.R. (1985)**: Subacute sclerosing panencephalitis. Current status. *Neurol Clin.* **3**: 179-196.
145. **World Health Organization; Genf, Schweiz (1996)**: Global Programme for Vaccines and Immunization/Expanded Programme on Immunization. Using Surveillance Data and Outbreak Investigations to Strengthen Measles Immunization Programmes (WHO/EPI/GEN/96.02).
146. **Robert Koch Institut (RKI, 2004)**: Bekämpfung der Masern und konnatalen Röteln: WHO-Strategie in der Europäischen Region und aktueller Stand in Deutschland. *Epidemiologisches Bulletin* vom 5. März 2004 /Nr. 10.
147. **Robert Koch Institut (RKI, 2010)**: RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte, Aktualisierte Fassung vom August 2010, Erstveröffentlichung im *Epidemiologischen Bulletin* 44/1999.
148. **Tipples G., Hiebert J. (2011)**: Detection of measles, mumps, and rubella viruses. *Methods Mol Biol.* **665**: 183-193.
149. **Illing S. und Claßen M. (2009)**: Kap. 6.5.14, Masern in: *Klinikleitfaden Pädiatrie*, 8. Auflage, Elsevier GmbH, Urban & Fischer Verlag München, 2009. Seite 261-262
150. **WHO/UNICEF/IVACG Task Force (1997)**: Vitamin A supplements: A guide to their use in the treatment and prevention of vitamin A deficiency and xerophthalmia, 2nd edn. WHO, Geneva, 1997
151. **Sudfeld C.R., Navar A.M., Halsey N.A. (2010)**: Effectiveness of measles vaccination and vitamin A treatment. *Int J Epidemiol.* **39**: 48-55.
152. **D'Souza R.M. & D'Souza R. (2002)**: Vitamin A for the treatment of children with measles--a systematic review. *J Trop Pediatr.* **48**: 323-327.

153. **Tatter S.B., Carlos R.A., O'Donovan C.A. (2000):** Intraparenchymal alpha interferon and intraventricular ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis (SSPE). *Neurology*. **54**: A430.
154. **Tomoda A., Shiraishi S., Hosoya M., Hamada A., Miike T. (2001):** Combined treatment with interferon-alpha and ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis. *Pediatr. Neurol.* **24**: 54-59.
155. **Gascon G.G., International Consortium on Subacute Sclerosing Panencephalitis (2003):** Randomized treatment study of inosiplex versus combined inosiplex and intraventricular interferon-alpha in subacute sclerosing panencephalitis (SSPE): international multicenter study. *J Child Neurol.* **18**: 819-827.
156. **Hara S., Kimura H., Hoshino Y., Hayashi N., Negoro T., Okumura A., Kajita Y., Sakuma T., Nakayama T., Hosoya M., Tomoda A., Morisima T. (2003):** Combination therapy with intraventricular interferon-alpha and ribavirin for subacute sclerosing panencephalitis and monitoring measles virus RNA by quantitative PCR assay. *Brain Dev.* **25**: 367-369.
157. **del Toro-Riera M., Macaya-Ruiz A., Raspall-Chaure M., Tallada-Serra M., Pasqual-López I., Roig-Quilis M. (2006):** Subacute sclerosing panencephalitis: combined treatment with interferon alpha and intraventricular ribavirin. *Rev Neurol.* **42**: 277-281.
158. **Klein N.P., Fireman B., Yih W.K., Lewis E., Kulldorff M., Ray P., Baxter R., Hambidge S., Nordin J., Naleway A., Belongia E.A., Lieu T., Baggs J., Weintraub E.; Vaccine Safety Datalink (2010):** Measles-mumps-rubella-varicella combination vaccine and the risk of febrile seizures. *Pediatrics*. **126**: e1-8.
159. **Robert Koch Institut (2011):** Mitteilung der Ständigen Impfkommision am Robert Koch-Institut. Empfehlungen der Ständigen Impfkommision (STIKO) am Robert Koch-Institut/Stand. Juli 2011, Epidemiologisches Bulletin vom 1. August 2011/ Nr. 30
160. **Robert Koch Institut (2010):** RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten - Merkblätter für Ärzte, Aktualisierte Fassung vom August 2010, Erstveröffentlichung im Epidemiologischen Bulletin 44/1999.
161. **Wakefield A.J. (1999):** MMR vaccination and autism. *Lancet*. **354**: 949-950.
162. **Taylor B., Miller E., Farrington C.P., Petropoulos M.C., Favot-Mayaud I., Li J., Waight P.A. (1999):** Autism and measles, mumps, and rubella vaccine:

- no epidemiological evidence for a causal association. *Lancet*. **353**: 2026-2029.
- 163. Mrozek-Budzyn D., Kiełtyka A., Majewska R. (2010):** Lack of association between measles-mumps-rubella vaccination and autism in children: a case-control study. *Pediatr Infect Dis J*. **29**: 397-400.
- 164. Napoli C., Lemieux C., Jorgensen R. (1990):** Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into *Petunia* Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell*. **2**: 279-289.
- 165. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. (1998):** Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. **391**: 806-811.
- 166. Couzin J. (2002):** Breakthrough of the year. Small RNAs make big splash. *Science*. **298**: 2296-2297.
- 167. Cerutti H. & Casas-Mollano J.A. (2006):** On the origin and functions of RNA-mediated silencing: from protists to man. *Curr Genet*. **50**: 81-99.
- 168. Sontheimer E.J. & Carthew R.W. (2005):** Silence from within: endogenous siRNAs and miRNAs. *Cell*. **122**: 9-12.
- 169. He L. & Hannon G.J. (2004):** MicroRNAs: small RNAs with a big role in gene regulation. *Nat Rev Genet*. **5**: 522-531.
- 170. Lee Y., Kim M., Han J., Yeom K.H., Lee S., Baek S.H., Kim V.N. (2004):** MicroRNA genes are transcribed by RNA polymerase II. *EMBO J*. **23**: 4051-4060.
- 171. Filippov V., Solovyev V., Filippova M., Gill S.S. (2000):** A novel type of RNase III family proteins in eukaryotes. *Gene*. **245**: 213-221.
- 172. Wu H., Xu H., Miraglia L.J., Crooke S.T. (2000):** Human RNase III is a 160-kDa protein involved in preribosomal RNA processing. *J Biol Chem*. **275**: 36957-36965.
- 173. Fortin K.R., Nicholson R.H., Nicholson A.W. (2002):** Mouse ribonuclease III. cDNA structure, expression analysis, and chromosomal location. *BMC Genomics*. **3**: 26.
- 174. Han J., Lee Y., Yeom K.H., Kim Y.K., Jin H., Kim V.N. (2004):** The Drosha-DGCR8 complex in primary microRNA processing. *Genes Dev*. **18**: 3016-3027.

175. **Landthaler M., Yalcin A., Tuschl T. (2004):** The human DiGeorge syndrome critical region gene 8 and Its D. melanogaster homolog are required for miRNA biogenesis. *Curr Biol.* **14:** 2162-2167.
176. **Denli A.M., Tops B.B., Plasterk R.H., Ketting R.F., Hannon G.J. (2004):** Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature.* **432:** 231-235.
177. **Gregory R.I., Yan K.P., Amuthan G., Chendrimada T., Doratotaj B., Cooch N., Shiekhattar R. (2004):** The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature.* **432:** 235-240.
178. **Bohnsack M.T., Czaplinski K., Gorlich D. (2004)** Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA.* **10:** 185-191.
179. **Bernstein E., Caudy A.A., Hammond S.M., Hannon G.J. (2001):** Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature.* **409:** 363-366.
180. **Chendrimada T.P., Gregory R.I., Kumaraswamy E., Norman J., Cooch N., Nishikura K., Shiekhattar R. (2005):** TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA processing and gene silencing. *Nature.* **436:** 740-744.
181. **Hammond S.M. (2005):** Dicing and slicing: the core machinery of the RNA interference pathway. *FEBS Lett.* **579:** 5822-5829.
182. **Kim V.N., Nam J.W. (2006):** Genomics of microRNA. *Trends Genet.* **22:**165-173.
183. **Liu J., Carmell M.A., Rivas F.V., Marsden C.G., Thomson J.M., Song J.J., Hammond S.M., Joshua-Tor L., Hannon G.J. (2004):** Argonaute2 is the catalytic engine of mammalian RNAi. *Science.* **305:** 1437-1441.
184. **Meister G., Landthaler M., Patkaniowska A., Dorsett Y., Teng G., Tuschl T. (2004):** Human Argonaute2 mediates RNA cleavage targeted by miRNAs and siRNAs. *Mol Cell.* **15:** 185-197.
185. **Song J.J., Smith S.K., Hannon G.J., Joshua-Tor L. (2004):** Crystal structure of Argonaute and its implications for RISC slicer activity. *Science.* **305:** 1434-1437.
186. **Parker J.S., Roe S.M., Barford D. (2004):** Crystal structure of a PIWI protein suggests mechanisms for siRNA recognition and slicer activity. *EMBO J.* **23:** 4727-4737.

187. **Rivas F.V., Tolia N.H., Song J.J., Aragon J.P., Liu J., Hannon G.J., Joshua-Tor L. (2005):** Purified Argonaute2 and an siRNA form recombinant human RISC. *Nat Struct Mol Biol.* **12**: 340-349.
188. **Wienholds E., Plasterk R.H. (2005):** MicroRNA function in animal development. *FEBS Lett.* **579**: 5911-5922.
189. **Seggerson K., Tang L., Moss E.G. (2002):** Two genetic circuits repress the *Caenorhabditis elegans* heterochronic gene *lin-28* after translation initiation. *Dev Biol.* **243**: 215-225.
190. **Sen G.L. & Blau H.M. (2005):** Argonaute 2/RISC resides in sites of mammalian mRNA decay known as cytoplasmic bodies. *Nat Cell Biol.* **7**: 633-636.
191. **Liu J., Valencia-Sanchez M.A., Hannon G.J., Parker R. (2005):** MicroRNA-dependent localization of targeted mRNAs to mammalian P-bodies. *Nat Cell Biol.* **7**: 719-723.
192. **Bumcrot D., Manoharan M., Koteliansky V., Sah D.W. (2006):** RNAi therapeutics: a potential new class of pharmaceutical drugs. *Nat Chem Biol.* **2**: 711-719.
193. **Shukla S., Sumaria C.S., Pradeepkumar P.I. (2010):** Exploring chemical modifications for siRNA therapeutics: a structural and functional outlook. *ChemMedChem.* **5**: 328-349.
194. **Zimmermann T.S., Lee A.C., Akinc A., Bramlage B., Bumcrot D., Fedoruk M.N., Harborth J., Heyes J.A., Jeffs L.B., John M., Judge A.D., Lam K., McClintock K., Nechev L.V., Palmer L.R., Racie T., Röhl I., Seiffert S., Shanmugam S., Sood V., Soutschek J., Toudjarska I., Wheat A.J., Yaworski E., Zedalis W., Koteliansky V., Manoharan M., Vornlocher H.P., MacLachlan I. (2006):** RNAi-mediated gene silencing in non-human primates. *Nature.* **441**: 111-114.
195. **Soutschek J., Akinc A., Bramlage B., Charisse K., Constien R., Donoghue M., Elbashir S., Geick A., Hadwiger P., Harborth J., John M., Kesavan V., Lavine G., Pandey R.K., Racie T., Rajeev K.G., Röhl I., Toudjarska I., Wang G., Wuschko S., Bumcrot D., Koteliansky V., Limmer S., Manoharan M., Vornlocher H.P. (2004):** Therapeutic silencing of an endogenous gene by systemic administration of modified siRNAs. *Nature.* **432**: 173-178.
196. **Wu Y., Navarro F., Lal A., Basar E., Pandey R.K., Manoharan M., Feng Y., Lee S.J., Lieberman J., Palliser D. (2009):** Durable protection from Herpes

- Simplex Virus-2 transmission following intravaginal application of siRNAs targeting both a viral and host gene. *Cell Host Microbe*. **5**: 84-94.
197. **Winston W.M., Molodowitch C., Hunter C.P. (2002)**: Systemic RNAi in *C. elegans* requires the putative transmembrane protein SID-1. *Science*. **295**: 2456-2459.
 198. **Duxbury M.S., Ashley S.W., Whang E.E. (2005)**: RNA interference: a mammalian SID-1 homologue enhances siRNA uptake and gene silencing efficacy in human cells. *Biochem Biophys Res Commun*. **331**: 459-463.
 199. **Wolfrum C., Shi S., Jayaprakash K.N., Jayaraman M., Wang G., Pandey R.K., Rajeev K.G., Nakayama T., Charrise K., Ndungo E.M., Zimmermann T., Koteliansky V., Manoharan M., Stoffel M. (2007)**: Mechanisms and optimization of in vivo delivery of lipophilic siRNAs. *Nat Biotechnol*. **25**: 1149-1157.
 200. **Tiemann K., Rossi J.J. (2009)**: RNAi-based therapeutics-current status, challenges and prospects. *EMBO Mol Med*. **1**: 142-151.
 201. **Lares M.R., Rossi J.J., Ouellet D.L. (2010)**: RNAi and small interfering RNAs in human disease therapeutic applications. *Trends Biotechnol*. **28**: 570-579.
 202. **Lin X., Ruan X., Anderson M.G., McDowell J.A., Kroeger P.E., Fesik S.W., Shen Y. (2005)**: siRNA-mediated off-target gene silencing triggered by a 7 nt complementation. *Nucleic Acids Res*. **33**: 4527-4535.
 203. **Richardson C.D., Scheid A., 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 or HA2 viral polypeptides. *Virology*. **105**: 205-222.
 204. **Eagle H. & Levine E.M. (1967)**: Growth regulatory effects of cellular interaction. *Nature*. **213**: 1102-1106.
 205. **Berridge, M. V. and Tan, A. S. (1993)**: Characterization of the cellular reduction of MTT. Subcellular localisation, substrate dependence and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Archiv. Biochem. Biophys*. **303**: 474-482.
 206. **Saiki R.K., Gelfand D.H., Stoffel S., Scharf S.J., Higuchi R., Horn G.T., Mullis K.B., Erlich H.A. (1988)**: Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*. **239**: 487-491.

207. **Birnboim H.C., Doly J. (1979):** A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* **7:** 1513-1523.
208. **Sanger F., Nicklen S., Coulson A.R. (1977):** DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA.* **74:** 5463-5467.
209. **Hirai H. (2010):** Basic Research on Cerebellar Gene Therapy Using Lentiviral Vectors. *Cerebellum.* **11:** 443-445
210. **Lois C., Hong E.J., Pease S., Brown E.J., Baltimore D. (2002):** Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science.* **295:** 868-872.
211. **Boden D., Pusch O., Silbermann R., Lee F., Tucker L., Ramratnam B. (2004):** Enhanced gene silencing of HIV-1 specific siRNA using microRNA designed hairpins. *Nucleic Acids Res.* **32:** 1154-1158.
212. **Pleasure S.J. & Lee V.M. (2003):** NTera 2 cells: a human cell line which displays characteristics expected of a human committed neuronal progenitor cell. *J Neurosci Res.* **35:** 585-602.
213. **Ludlow M., McQuaid S., Cosby S.L., Cattaneo R., Rima B.K., Duprex W.P. (2005):** Measles virus superinfection immunity and receptor redistribution in persistently infected NT2 cells. *J Gen Virol.* **86:** 2291-2303.
214. **Dörries R., ter Meulen V. (1984):** Detection and identification of virus specific oligoclonal IgG in unconcentrated cerebrospinal fluid by immunoblot technique. *J. Neuroimmunol.* **7:** 77-89.
215. **Fujinami R. S., Oldstone M.B.A. (1979):** Antiviral antibody reacting on the plasma membrane alters measles virus expression inside the cell. *Nature.* **279:** 529-530.
216. **Mehta P.D., Kulczycki J., Mehta S.P., Sobczyk W., Coyle P.K., Sersen E.A., Wisniewski H.M. (1992):** Increased levels of beta 2-microglobulin, soluble interleukin-2 receptor, and soluble CD8 in patients with subacute sclerosing panencephalitis. *Clin. Immunol. Immunopathol.* **65:** 53-59.
217. **Shim M.S., Kwon Y.J. (2010):** Efficient and targeted delivery of siRNA in vivo. *FEBS J.* **277:** 4814-27
218. **Nuhn L., Hirsch M., Krieg B., Koynov K., Fischer K., Schmidt M., Helm M., Zentel R. (2012):** Cationic nanohydrogel particles as potential siRNA carriers for cellular delivery. *ACS Nano.* **6:** 2198-2214.

219. **Dreyer J.L. (2010):** Lentiviral vector-mediated gene transfer and RNA silencing technology in neuronal dysfunctions. *Methods Mol Biol.* **614**: 3-35.
220. **Walton S.P., Wu M., Gredell J.A., Chan C. (2010):** Designing highly active siRNAs for therapeutic applications. *FEBS J.* **277**: 4806-4813.
221. **Zhao M.G., Toyoda H., Lee Y.S., Wu L.J., Ko S.W., Zhang X.H., Jia, Y., Shum F., Xu H., Li B.M., Kaang B.K., Zhuo M. (2005):** Roles of NMDA NR2B subtype receptor in prefrontal long-term potentiation and contextual fear memory. *Neuron* **47**: 859–872.
222. **Alvarez-Erviti L., Seow Y., Yin H., Betts C., Lakhali S., Wood M.J. (2011):** Delivery of siRNA to the mouse brain by systemic injection of targeted exosomes. *Nat Biotechnol.* **29**: 341-345.
223. **Jean A., Conductier G., Manrique C., Bouras C., Berta P., Hen R., Charnay Y., Bockaert J., Compan V. (2007):** Anorexia induced by activation of serotonin 5-HT₄ receptors is mediated by increases in CART in the nucleus accumbens. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **104**:16335–16340.
224. **Lingor P., Koeberle P., Kugler S., Bahr M. (2005):** Down-regulation of apoptosis mediators by RNAi inhibits axotomy-induced retinal ganglion cell death in vivo. *Brain* **128**: 550–558.
225. **Makimura H., Mizuno T.M., Mastaitis J.W., Agami R., Mobbs C.V. (2002):** Reducing hypothalamic AGRP by RNA interference increases metabolic rate and decreases body weight without influencing food intake. *BMC Neurosci.* **7**;3: 18.
226. **Manrique C., Compan V., Rosselet C., Duflo S.G. (2009):** Specific knock-down of GAD67 in the striatum using naked small interfering RNAs. *J. Biotechnol.* **142**: 185–192.
227. **Chen S.H., Zhaori G. (2011):** Potential clinical applications of siRNA technique: benefits and limitations. *Eur. J. Clin. Invest.* **41**: 221–232.
228. **Hu Q., Chen C., Yan J., Yang X., Shi X., Zhao J., Lei J., Yang L., Wang K., Chen L., Huang H., Han J., Zhang J.H., Zhou C. (2009):** Therapeutic application of gene silencing MMP-9 in a middle cerebral artery occlusion-induced focal ischemia rat model. *Exp. Neurol.* **216**: 35–46.
229. **Thakker D.R., Natt F., Husken D., van der Putten H., Maier R., Hoyer D., Cryan J.F. (2005):** siRNA-mediated knockdown of the serotonin transporter in the adult mouse brain. *Mol. Psychiatry* **10**: 782–789, 714.

230. Nakajima H., Kubo T., Semi Y., Itakura M., Kuwamura M., Izawa T., Azuma Y.T., Takeuchi T. (2012): A rapid, targeted, neuron-selective, in vivo knockdown following a single intracerebroventricular injection of a novel chemically modified siRNA in the adult rat brain. *J Biotechnol.* **157**: 326-333.
231. El Mubarak H.S., van de Bildt M.W., Mustafa O.A., Vos H.W., Mukhtar M.M., Ibrahim S.A., Andeweg A.C., El Hassan A.M., Osterhaus A.D., de Swart R.L. (2002): Genetic characterization of wild-type measles viruses circulating in suburban Khartoum, 1997-2000. *J Gen Virol.* **83**: 1437-1443.
232. Rima B. K., Earle J.A.P., Baczko K., ter Meulen V., Carabana J., Caballero M., Celma M.L., Fernandez-Munoz R. (1997): Sequence divergence of measles virus haemagglutinin during natural evolution and adaptation to cell culture. *J. Gen. Virol.* **78**: 97-106.
233. Das A. T., Brummelkamp T.R., Westerhout E.M., Vink M., Madiredjo M., Bernards R. (2004): Human immunodeficiency virus type 1 escapes from RNA interference-mediated inhibition. *J. Virol.* **78**: 2601-2605.
234. Gitlin L., Stone J.K., Andino R. (2005): Poliovirus escape from RNA interference: short interfering RNA-target recognition and implications for therapeutic approaches. *J. Virol.* **79**: 1027-1035.
235. Consiglio A., Gritti A., Dolcetta D., Follenzi A., Bordignon C., Gage F.H., Vescovi A.L., Naldini L. (2004): Robust in vivo gene transfer into adult mammalian neural stem cells by lentiviral vectors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**: 14835-14840.
236. Hughes S.M., Moussavi-Harami F., Sauter S.L., Davidson B.L. (2002): Viral-mediated gene transfer to mouse primary neural progenitor cells. *Mol. Ther.* **5**: 16-24.
237. Lois C., Hong E.J., Pease S., Brown E.J., Baltimore D. (2002): Germline transmission and tissue-specific expression of transgenes delivered by lentiviral vectors. *Science* **295**: 868-872.
238. Naldini L., Blomer U., Gallay P., Ory D., Mulligan R., Gage F.H., Verma I.M., Trono D. (1996): In vivo gene delivery and stable transduction of nondividing cells by a lentiviral vector. *Science* **272**: 263-267.
239. Otaki M., Jiang D.P., Sasayama M., Nagano-Fujii M., Hotta H. (2007): Generation of recombinant adenovirus expressing siRNA against the L mRNA of measles virus and subacute sclerosing panencephalitis virus. *Microbiol. Immunol.* **51**: 985-991.
240. Schubert S., Möller-Ehrlich K., Singethan K., Wiese S., Duprex W.P.,

Rima B.K., Niewiesk S., Schneider-Schaulies J. (2006): A mouse model of persistent brain infection with recombinant Measles virus. *J Gen Virol.* **87**: 2011-2019

8. Anhang

8.1 Abkürzungsverzeichnis

A	Adenosin
Ab	Antikörperbody (engl.: antibody)
Abb.	Abbildung
AG	Arbeitsgruppe
Ago	Argonaute
Amp	Ampicillin
APME	Para- bzw. postinfektiöse Masernenzephalitis
ApoB	Apolipoprotein B
aqua dest.	Destilliertes Wasser (dH_2O)
ATV	antibiotic-trypsin-Versene
BRD	Bundesrepublik Deutschland
BSA	N,O-Bis(trimethylsilyl)acetamid
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin und Nichtsrukturprotein des Masernvirus
CA	Carcinom, Karzinom
ca.	circa
cDNA	„complementary DNA“
C. elegans	Caenorhabditis elegans
CD	cluster of differentiation
CDV	Hundestaupe Virus (engl.: Canine Distemper Virus)
CIAP	„calf intestine alkaline phosphatase“
Da	Dalton

DC	Dendritische Zelle
dH ₂ O	destilliertes Wasser
ddH ₂ O	doppelt destilliertes Wasser
HBS	„Hepes-buffered saline“
DGCR 8	DiGeorge Syndrome Critical Region Gene 8-Protein
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	2'-Desoxyribonukleosid-5'-Triphosphat
ddNTP	Didesoxyribonukleosid-Triphosphat
Dr.	Doktor
dsDNS	doppelsträngige DNA
dsRNA	doppelsträngige RNA
dt.	deutsch
E. coli	Escheria coli
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EEG	Elektroenzephalogramm
eGFP	„enhanced green fluorescent protein“
engl.	englisch
EpR	Epithelzellrezeptor
et al.	„und andere“
etc.	„et cetera“
F	Fusionsprotein
FACS	Durchflusszytometrie (engl.: <i>fluorescence activated cell sorting</i>)
FcγRII/CD32	muriner Fc-Rezeptoren des Typs IgG II
FCS	Fetales Kälberserum

FIP	„fusion inhibitory peptide“
FSC	„forward-scatter“
G	Guanosin
Gly	Glycin
GTP	Guanosintriphosphat
h	Stunde(n)
H	Hämagglutinin
HAART	Hochaktive antiretrovirale Therapie
HBMEC	„Human Brain Microvascular Endothelial Cell“
HHV	Humanes Herpesvirus
HeV	Hendra-Virus
HIV	Humanes Immundefizienzvirus
HMPV	Humanes Metapneumovirus
HPIV	Humanes Parainfluenzavirus
HPLC	„high performance liquid chromatography“
HQ	Hauptquartier (engl.: headquarter)
HRSV	Humanes Respiratorisches Synzytialvirus
HSP72	„70kD heat-shock protein“
HUVEC	Human Umbilical Vein Endothelial Cell
H ₂ O	Wasser
ICTV	International Committee on Taxonomy of Viruses
Ifih1	„interferon-induced helicase C domain-containing protein 1“
IFN	Interferon
IfSG	Infektionsschutzgesetz
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin

IRF-3	„interferon regulatory factor-3“
JAK	Januskinase
Kap.	Kapitel
kb	Kilobase
Kap.	Kapitel
L	Large-Protein
LB-Medium	„lysogeny broth medium“
log	dekadischer Logarithmus
LTR	„long terminal repeats“
m	Masse
M	Matrixprotein
MAb	Monoklonaler Antikörper
mcs	„multiple cloning site“
MDA5	„melanoma-differentiation-associated gene 5“
MEM	„minimum essential medium“
MHC	„major histocompatibility complex“
MIBE	Einschlusskörperchenzephalitis (engl.: measles inclusion-body encephalitis)
min	Minute(n)
miRNA	microRNA
mM	mmol/Liter
MMRV	Masern-Mumps-Röteln-Virus
MOI	„multiplicity of infection“
mol	Einheit der Stoffmenge (Mol)
mRNA	„messenger RNA“
MS	Multiple Sklerose

MTT	Tetrazolium-Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid
MuV	Mumpsvirus
MV	Masernvirus
MVwt	Masernvirus-Wildtyp
N	Nukleokapsidprotein
n/a	nicht angegeben
NCS	„non coding sequences“
NiV	Nipahvirus
NR	Nukleoprotein-Rezeptor
nt	Nukleotid
OD	optische Dichte
ORF	„open reading frame“
P	Phosphoprotein
PAZ	PIWI-Argonaut-Zwille
P-bodies	„RNA processing bodies“
PBS	„phosphate buffered saline“
PCR	Polymerasekettenreaktion
PCT	C-terminale Region des P-Proteins
PDV	Robbenstaupevirus
PEI	Polyethylenimin
pfu	„plaque forming units“
pH	„potentia hydrogenii“
Phe	Phenylalanin
piNT2-Zellen	Persistierend infizierte NT2-Zellen
PIWI	„P-element-induced wimpy testis“

PMD	„P multimerization domain“
PNT	N-terminale Region
PPRV	Pestes-des-Petits-Ruminants-Virus
Prof.	Professor
p.t.	„post transductionem“
RaRP	RNA-abhängige RNA-Polymerase
rev	Akzessorisches Gen der Lentiviren
RIG-I	„retinoic acid-inducible gene I“
RISC	RNA-induced silencing complex
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure
RNAi	RNA-Interferenz
RNP	Ribonukleinkomplex
rpm	Rotationen pro Minute
RPV	Rinderpestvirus
RRE	„rev responsive element“
RT	Realttime und Raumtemperatur
s	Sekunde
s.	siehe
SDS	Natriumdodecylsulfat
sec	Sekunde(n)
siRNA	„short interfering RNA“
shRNA	„short hairpin RNA“
SLAM	signalling lymphocytic activation molecule
s.o.	siehe oben
sog.	sogenannte/r

SSC	„side-scatter“
ssDNA	einsträngige DNA
SSPE	Subakute sklerosierende Panencephalitis
St.	Sankt
STAT	„Signal Transducer and Activator of Transcription“
STIKO	ständige Impfkommission
T	Thymidin
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Acetat-EDTA
TE-Puffer	Tris-EDTA-Puffer
TGN	Trans-Golgi-Netzwerk
TRBP	„human immunodeficiency virus transactivating response RNA-binding protein“
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
U	Einheit der Enzymaktivität
ÜN	über Nacht
UNICEF	„United Nations Children’s Fund“
US/USA	Vereinigte Staaten/Vereinigte Staaten von Amerika
UTR	Untranslatierte Region
UV	Ultraviolett
V	Volumen und Nichtstrukturprotein des Masernvirus
VIM	Institut für Virologie und Immunbiologie (Universität Würzburg)
v/v	Volumenprozent
VZV	Varizella-zoster-Virus
WHO	„World Health Organisation“

WRE	„Wnt-responsive element“
w/v	Massenvolumenprozent
XD	X-Domäne
Z	Benzyloxycarbonyl-Schutzgruppe
z.B	zum Beispiel
ZNS	Zentrales Nervensystem

Maßeinheiten entsprechen dem Internationalen Einheitensystem („*Système internationale d’unités*“, *SI*). Summenformeln werden nach *IUPAC* („*International Union of Pure and Applied Chemistry*“) bezeichnet.

8.2 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Eine Übersicht der Virusfamilie <i>Paramyxoviridae</i> und deren humanpathogene Vertreter	1
Abb. 1.2	Masernviruspartikel	3
Abb. 1.3	Genomaufbau des MV	4
Abb. 1.4	Übersicht der weltweiten Maserninzidenz im Zeitraum von Juli 2010 bis Januar 2011	14
Abb. 1.5	In der <i>BRD</i> registrierte Masernfälle von 2003 bis 2010	15
Abb. 1.6	Klinisches Bild der Masernvirusinfektion	18
Abb. 1.7	Erscheinungsbild des Masernexanthems im Verlauf der Infektion	18
Abb. 1.8	Verlauf und Stadien der akuten Masern	19
Abb. 1.9	<i>Rademecker-Komplexe</i> während einer EEG-Aufzeichnung	24
Abb. 1.10	Schematische Darstellung des <i>siRNA</i> und <i>miRNA</i> induzierten „ <i>Gene-silencing</i> “	30
Abb. 1.11	Schema der <i>Slicer-Katalyse</i>	32
Abb. 1.12	Schema der Wege einer Genexpression bezüglich <i>miRNA</i>	33
Abb. 2.1	<i>DNA-Standard GeneRuler™</i> 1 kb DNA-Ladder	43
Abb. 4.1	Schema des <i>RNAi</i> -Indikatorsystems	83
Abb. 4.2	Schematischer Aufbau von <i>pF6GW</i>	83
Abb. 4.3	Schema der zur <i>siRNA</i> -Expression verwendeten DNA-Oligonukleotide	85
Abb. 4.4	Aufnahme der Gelelektrophorese von <i>pF6gW</i> nach dem Verdau mit <i>HpaI</i> und <i>XhoI</i>	86
Abb. 4.5	Sequenzierung von <i>pF6gW-ctrl</i>	87
Abb. 4.6	Sequenzierung von <i>pF6gW-L4, -L6, -L7</i>	87
Abb. 4.7	Sequenzierung von <i>pF6gW-M1, -M3, -M4</i>	88
Abb. 4.8	Sequenzierung von <i>pF6gW-N1, -N2, -N3</i>	89

Abb. 4.9	Sequenzierung von <i>pF6gW-N1, -N2, -N3</i>	89
Abb. 4.10	Ermittelte Sequenz der <i>shRNAs N2a</i> und <i>P6a</i> und Vergleich mit <i>P6</i> und <i>N2</i>	90
Abb. 4.11	Expression von <i>eGFP</i> nach Transfektion von <i>pF6gW-ctrl</i> in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm	91
Abb. 4.12	Expression von <i>eGFP</i> nach Transfektion von <i>pF6gW-L4, -L6</i> und <i>-L7</i> in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm.....	92
Abb. 4.13	Expression von <i>eGFP</i> nach Transfektion von <i>pF6gW-M1, -M3</i> und <i>-M4</i> in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm.....	92
Abb. 4.14	Expression von <i>eGFP</i> nach Transfektion von <i>pF6gW-N1, -N2</i> und <i>-N3</i> in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm.....	93
Abb. 4.15	Expression von <i>eGFP</i> nach Transfektion von <i>pF6gW-P1, -P2</i> und <i>-P6</i> in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm.....	93
Abb. 4.16	Übersicht der Ergebnisse des <i>MTT</i> -Zytotoxizitätstest.....	94
Abb. 4.17	Sequenz <i>pDsRed2-C1</i> vor Mutagenese	95
Abb. 4.18	Sequenz <i>pDsRed2-C1</i> nach Mutagenese	96
Abb. 4.19	Durch Sequenzierung bestätigter Erfolg der Mutagenese im Bereich der <i>mcs</i>	96
Abb. 4.20	Gelelektrophorese des enzymatischen Verdaus von <i>pDsRed-C1-stop</i> mit <i>EcoRI</i>	97
Abb. 4.21	Gelelektrophorese nach durchgeführter PCR der vier Indikatorplasmide	99
Abb. 4.22	Sequenzierung der vier Indikatorplasmide <i>pDsRed2-C1-stop-L, -M, -N</i> und <i>-P</i>	100
Abb. 4.23	Expression von <i>DsRed2</i> nach Transfektion von <i>pDsRed2-C1-stop-L, -M, -N</i> und <i>-P</i> in 293T-Zellen als Darstellung im Histogramm	101
Abb. 4.24	Übersicht der Transfektionseffizienz der getesteten Zellarten	104
Abb. 4.25	Vergleich bezüglich einer Entwicklung der Expression von <i>DsRed2</i> und <i>eGFP</i>	105
Abb. 4.26	Beispielhafte Darstellung der FACS-Auswertung des Indikatorsystems	108

Abb. 4.27	Darstellung beider Auswertungsformen	109
Abb. 4.28	Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von <i>pF6gW-L4</i> , <i>-L6</i> und <i>-L7</i> und <i>pDsRed2-C1-stop-L</i>	110
Abb. 4.29	Auswertung der Anzahl der Zellen in den Gates 1 und 2 bei einer Anwendung von <i>pF6gW-L4</i> , <i>-L6</i> und <i>-L7</i> und <i>pDsRed2-C1-stop-L</i>	110
Abb. 4.32	Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von <i>pF6gW-M1</i> , <i>-M3</i> und <i>-M4</i> und <i>pDsRed2-C1-stop-M</i>	111
Abb. 4.33	Auswertung der Anzahl der Zellen in den Gates 1 und 2 bei einer Anwendung von <i>pF6gW-M1</i> , <i>-M3</i> und <i>-M4</i> und <i>pDsRed2-C1-stop-M</i>	111
Abb. 4.34	Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von <i>pF6gW-N1</i> , <i>-N2</i> und <i>-N3</i> und <i>pDsRed2-C1-stop-N</i>	112
Abb. 4.35	Auswertung der Anzahl der Zellen in den Gates 1 und 2 bei einer Anwendung von <i>pF6gW-N1</i> , <i>-N2</i> und <i>-N3</i> und <i>pDsRed2-C1-stop-N</i>	112
Abb. 4.36	Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von <i>pF6gW-P1</i> , <i>-P2</i> und <i>-P6</i> und <i>pDsRed2-C1-stop-P</i>	113
Abb. 4.37	Auswertung der Anzahl der Zellen in den Gates 1 und 2 bei einer Anwendung von <i>pF6gW-P1</i> , <i>-P2</i> und <i>-P6</i> und <i>pDsRed2-C1-stop-P</i>	113
Abb. 4.38	Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von <i>pF6gW-N2a</i> und <i>pDsRed2-C1-stop-N</i> verglichen mit <i>pF6gW-N2</i>	115
Abb. 4.39	Auswertung der Intensität der Rotfluoreszenz bei einer Anwendung von <i>pF6gW-P6a</i> und <i>pDsRed2-C1-stop-P</i> verglichen mit <i>pF6gW-P6</i> ..	115
Abb. 4.40	Aufnahmen simultan in- und transfizierter Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop	117
Abb. 4.41	Stadien der Entwicklung einer mit <i>MVEntagCAMHeHCRed</i> persistierend infizierten NT2-Zelllinie in chronologischer Reihenfolge	119
Abb. 4.42	FACS-Auswertung der persistierend infizierten NT2-Zellen.....	120
Abb. 4.43	FACS-Auswertung der piNT2-Zellen nach Antikörperfärbung.....	121
Abb. 4.44	293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypisierten retroviralen	

	Partikeln, erzeugt mit <i>pF6gW</i> (“mock”-Vektor, Positivkontrolle) und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert.....	123
Abb. 4.45	293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypisierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit <i>pF6gW-ctrl</i> und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert	123
Abb. 4.46	293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypisierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit <i>pF6gW-L4</i> und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert	124
Abb. 4.47	293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypisierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit <i>pF6gW-M4</i> und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert	124
Abb. 4.48	293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypisierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit <i>pF6gW-N1</i> und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert	125
Abb. 4.49	293T-Zellen wurden transduziert mit einer Verdünnungsreihe (siehe Beschriftung) von viralen VSV-G-pseudotypisierten retroviralen Partikeln, erzeugt mit <i>pF6gW-P6</i> und ihre Autofluoreszenz im Mikroskop fotografiert	125
Abb. 4.50	Aufnahme der transduzierten piNT2-Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop und anschließender Überlagerung des Rot- und Grünkanals 6 Tage nach erfolgter Transduktion.....	127
Abb. 4.51	Aufnahme der transduzierten piNT2-Zellen mit dem Fluoreszenzmikroskop und anschließender Überlagerung des Rot- und Grünkanals 12 Tage nach erfolgter Transduktion	128
Abb. 4.52	Zusammenfassung der durchflusszytometrischen Auswertung der transduzierten piNT2-Zellen mit der Zugabe von <i>FIP</i> (A) und ohne <i>FIP</i> (B)	130
Abb 4.53	Diagramm bezüglich der Auswertung der transduzierten lentiviralen Partikel in mit <i>FIP</i> behandelten piNT2-Zellen.....	131
Abb. 4.54	Anzahl der Zellen im <i>HCRed+/eGFP+-</i> Bereich nach Transduktion der lentiviralen Partikel in mit <i>FIP</i> behandelte piNT2-Zellen	133

Abb. 4.55 Diagramm bezüglich der Auswertung der transduzierten lentiviralen Partikel in piNT2-Zellen ohne die Behandlung mit <i>FIP</i>	134
Abb. 4.56 Anzahl der Zellen im <i>HCRed+/eGFP+</i> - Bereich nach Transduktion der lentiviralen Partikel in nicht mit <i>FIP</i> behandelten piNT2-Zellen.....	134
Abb. 4.57 Vergleich des Prozentsatzes <i>HCRed-/eGFP+</i> -Zellen bezüglich einer Behandlung mit <i>FIP</i>	136
Abb. 4.58 <i>Overlay Assay</i> mit einem aus Vero-Zellen bestehenden Zellrasen und darauf hinzugefügten vormals transduzierten piNT2-Zellen nach 72-stündiger Inkubation.....	138
Abb. 4.59 Schematische Darstellung der Umklonierung von <i>pF6gW</i> zu <i>pF6gW-Thy1.1</i>	140
Abb. 4.60 Verdau der Plasmide <i>pF6gW-Thy1.1-M4</i> bzw. <i>-P6</i> mit <i>EcoRI</i> und <i>XhoI</i>	141
Abb. 4.61 Fluoreszenzmikroskopisches Bild der Endpunkttitration der lentiviralen Partikel	143
Abb. 4.62 Fluoreszenzmikroskopisches Bild der Endpunkttitration der lentiviralen Partikel	144

8.3 Tabellenverzeichnis

Tab. 2.1	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen.....	37
Tab. 2.2	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Viren	38
Tab. 2.3	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Zellen.....	39
Tab. 2.4	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Oligonukleotide zur Herstellung von shRNAs.....	41
Tab. 2.5	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Antibiotika und deren Konzentration in der Stammlösung.....	47
Tab. 2.6	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Primärantikörper	47
Tab. 2.7	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Sekundärantikörper.....	48
Tab. 2.8	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Chemikalien	49
Tab. 2.9	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Enzyme	49
Tab. 2.10	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Restriktionsenzyme	50
Tab 2.11	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Puffer für die Verwendung von Restriktionsenzymen.....	50
Tab. 2.12	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Kits.....	50
Tab 2.13	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Verbrauchsmaterialien.....	52
Tab. 2.14	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Glasmaterialien.....	52
Tab. 2.15	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Geräte	55
Tab. 2.16	Übersicht der in der vorliegenden Arbeit verwendeten Software.....	56
Tab. 4.1	Übersicht der Restriktionsenzyme, mit denen die DNA der MV-Gene L, M, N und P aus den verschiedenen Plasmiden gewonnen wurden.....	98
Tab. 4.2	Verwendete Mengen an Zellen für die Überprüfung ihrer Fähigkeit zur Kotransfizierbarkeit	103

Tab. 4.3	Eingesetzte Mengen von Plasmid-DNA und Transfektionsmedium (<i>PEI</i>)	103
Tab. 4.4	Eingesetzte Mengen von Plasmid-DNA und Transfektionsmedium <i>PEI</i> in der Anwendung des <i>RNAi</i> -Indikatorsystems.....	107
Tab. 4.5	Zusammenfassung der ausgewählten <i>shRNAs</i>	114

9 Danksagung

Ich danke...

... meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies für die Überlassung des interessanten Themas, die spitzenmäßige 1a-Betreuung, die Unterstützung und das forwährende Vertrauen während der Anfertigung der vorliegenden Arbeit. Danke!

... Frau Prof. Dr. med. Schubert-Unkmeir für die freundliche Übernahme des Koreferats.

... meiner Betreuerin Dr. rer. nat. Katrin Singethan für ihre außerordentlich gutes Teaching, der das hoffnungslose Unterfangen geglückt ist, einem ahnungslosen Medizinstudenten die Tiefen der Molekularbiologie und Virologie beizubringen und mich überzeugen konnte, wenn es um Fragen der Frischekonservierung von Lebensmitteln geht, nur noch Produkte eines namhaften Herstellers zu kaufen, der bei wildfremden Leuten zuhause "Parties" veranstaltet.

... meiner Lieblings-MTA Sabine Kendl, die immer weiß wo etwas steht, liegt, eingefroren oder wo zu bestellen ist.

... Dr. Martin Ludlow for your help in generating persistently infected NT2-cells.

... Dr. Markus Fehrholz für die anregenden Diskussionen über die Biologie, die Partnerschaft, die Liebe, Schalke und das Leben im Allgemeinen.

... Dr. Dajana Reuter für die ermunternde Stimmung im Labor, die Gespräche über Ostdeutschland und das Teilhaben an der "Faszination Mittelalter in der Neuzeit".

... Frau Prof. Dr. rer. nat. Sybille Schneider-Schaulies samt Arbeitsgruppe: Elita Avota, Barbara Schelle, Beatrix Loth, Andreas "Andi" Salditt, Ibrahim „Ibo“ Boussaad, Evelyn "Evi" Gassert, Nicolette Reckemmer, Hieu Tran-Van, Susanne "Susi" Köthe, Charlene Börtlein, Carolin Götz, sowie allen anderen für die kollegiale Stimmung sowie die schöne Zeit außerhalb des Labors.

Danksagung

... meiner Familie, die mich in allen Lebenslagen unterstützt und ermuntert haben und maßgeblich für die Fertigstellung dieser Arbeit mitverantwortlich sind. Danke Mama für die Korrekturen!

10 Curriculum Vitae

Geburtsdatum

16.04.1983

Geburtsort

Schwäbisch Gmünd

Familienstand

ledig; keine Kinder

Nationalität

deutsch

Ausbildung

Ärztliche Tätigkeit

Seit 1. März 2011 Assistenzarzt in der
Abteilung für Orthopädie und Unfallchirurgie
des Robert-Bosch-Krankenhauses Stuttgart

Praktisches Jahr

Chirurgie

Universitätsklinikum Würzburg
Klinik und Poliklinik für Unfall-, Hand-, Plastische- &
Wiederherstellungschirurgie

24. Mai - 18. Juli 2010

Nepean Hospital Sydney, Australia
Department of Surgery

29. März - 23. Mai 2010

Wahlfach Orthopädie

Kantonales Spital Walenstadt, Schweiz

07. Dezember - 28. März 2010

Innere Medizin

Universitätsklinikum Würzburg
Medizinische Klinik & Poliklinik II, Bereich Onkologie

4. Oktober - 6. Dezember 2009

Royal Victoria Hospital Belfast, Northern Ireland
Department of Cardiology

17. August - 3. Oktober 2009

Famulaturen

Concord Repatriation Hospital Sydney, Australia
Department of Ophthalmology

März 2009 - April 2009

Allgemeinarztpraxis Dres. Elmar & Christine Schuhmacher
in Mutlangen

September 2008 - Oktober 2008

Universitätsklinikum Würzburg
Medizinische Klinik & Poliklinik I, Bereich Kardiologie

August 2008 - September 2008

Helios-Klinikum Erfurt
Klinik für Mund-, Kiefer & Gesichtschirurgie

August 2008

Universitätsklinikum Würzburg
Institut für Virologie & Immunbiologie,
Laborfamulatur in AG Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies

September 2007 - Oktober 2007

Marienhospital Stuttgart
Klinik für Orthopädie & Unfallchirurgie

Februar 2007 - März 2007

Studium

Studium der Humanmedizin an der
Bayerischen Julius-Maximilian-Universität Würzburg

Oktober 2004 - November 2010

Studienverlauf

1. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
2. Abschnitt der Ärztlichen Prüfung und Abschluss des Staatsexamens Humanmedizin

12. September 2006

04. November 2010

Thema der Promotion:

„Inhibition der Masernvirenreplikation durch RNA-Interferenz“
am Institut für Virologie und Immunbiologie der Universität
Würzburg, Arbeitsgruppe Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies

Zivildienst

Lebenshilfe e.V. Schwäbisch Gmünd,
Behindertenbetreuung im Rahmen der
Familienunterstützenden Dienste

September 2003 - Juni 2004

Schulbildung

Scheffold-Gymnasium in Schwäbisch Gmünd

Abschluss: Allgemeine Hochschulreife
Leistungskurse: Englisch & Erdkunde

24. Juni 2003

Publikation

Zinke M., Kendl S., Singethan K., Fehrholz M., Reuter D., Rennick L., Herold MJ. and Schneider-Schaulies J.

Clearance of measles virus from persistently infected cells by short hairpin RNA

Journal of Virology, Juni 2009

Posterpräsentation

18th Annual Meeting der Gesellschaft für Virologie in Heidelberg mit dem Titel:

„Investigating the therapeutic potential of siRNA against persistent measles virus infections“

5. - 8. März 2008

Vorträge

Teilnahme am Promomed Kongress der Universität Würzburg
“Inhibition der Masernvirenreplikation durch RNA-Interferenz”

Juni 2009

Teilnahme am XVII. Measles Meeting in Würzburg
“Inhibition of viral Replication through RNAi”

September 2008

Stuttgart, den 1. September 2012