

**Aus dem Institut für Virologie des Fachbereichs Medizin
der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. Stephan Becker**

**Die Nipahvirus Glykoproteine
Ihre Verteilung in infizierten und transfizierten polarisierten
Epithelzellen und die Identifizierung basolateraler Transportsignale**

Inaugural-Dissertation
Zur Erlangung des Doktorgrades der Biologie
(Dr. rer. nat.)

dem Fachbereich Biologie
der Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Carolin Weise
aus Rathenow

Marburg an der Lahn
November 2011

Vom Fachbereich Biologie

Der Philipps-Universität Marburg als Dissertation am 21.12.2011 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. Wolfgang Buckel

Zweitgutachter: Prof. Dr. Andrea Maisner

Tag der mündlichen Prüfung am: 13.01.2012

I	Zusammenfassung	1
II.	Einleitung	3
1.	Das Nipahvirus (NiV)	3
1.1.	Taxonomie	3
1.2.	Epidemiologie	4
1.3.	Klinik, Pathogenese und Diagnose	6
1.4.	Prophylaxe und Therapie	8
1.5.	Virusaufbau	10
1.5.1.	Genomaufbau und Replikation	10
1.5.2.	Die viralen Glykoproteine	13
1.5.2.1.	Das Fusionsprotein (F)	13
1.5.2.2.	Das Glykoprotein (G)	15
2.	Polarisierte Epithelzellen	16
2.1.	Gerichteter Proteintransport in polarisierten Epithelzellen	17
2.2.	Transportsignale von Proteinen in polarisierten Epithelzellen	19
2.2.1.	Signale für den apikalen Proteintransport	19
2.2.2.	Signale für den basolateralen Proteintransport	19
2.2.3.	Zelluläre Adaptorprotein(AP)-Komplexe	20
2.3.	Virusinfektion von polarisierten Epithelzellen	22
3.	Fragestellung und Zielsetzung	24
III.	Material	26
IV	Methoden	36
1.	Molekularbiologische Methoden	36
1.1.	Polymerase-Kettenreaktion	36
1.2	Gezielte Mutagenese (Austausch einzelner Aminosäuren)	37
1.3.	Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel	37
1.4.	Restriktionsverdau	39
1.5.	Vektorverdau und Dephosphorylierung	39
1.6.	Ligation	40
1.7.	Hitzeschock-Transformation	40
1.8.	DNA-Präparation	41
1.9.	Quantifizierung von Nukleinsäure	42
2.	Zellbiologische Methoden	42

2.1.	Zellkultur	42
2.2.	Kultivieren von MDCK-Zellen auf permeablen Filtermembranen	43
2.3.	Transfektion durch Lipofektion	44
2.3.1.	Transfektion von nicht polaren Zellen in Kulturschalen oder auf Deckgläschen durch Lipofektion	45
2.3.2.	Transfektion von polarisierten MDCK-Zellen durch Lipofektion	45
2.4.	Herstellung stabil-exprimierender MDCK-Zellen	46
2.4.1.	Stabile Proteinexpression in MDCK-Zellen durch Lipofektion	46
2.4.2.	Stabile Proteinexpression in MDCK-Zellen durch Transduktion mit retroviralen Pseudotypen	48
2.4.2.1.	Transfektion von 293T-Zellen	49
2.4.2.2.	Transduktion von MDCK-Zellen	51
2.5.	Nipahvirus-Infektion	51
2.5.1.	Infektion von Vero- oder MDCK-Zellen auf Deckgläschen	51
2.5.2.	Infektion von polarisierten MDCK-Zellen auf Transwell-Filtern	52
2.5.3.	Bestimmung der Virustiter im Kulturüberstand mittels Endpunkttitration (TCID ₅₀ -Methode)	52
3.	Biochemische und immunologische Nachweismethoden	53
3.1.	GFP-Fluoreszenz Nachweis	53
3.2.	Indirekte immunfluoreszenzanalyse (IF)	53
3.2.1.	IF zur Untersuchung der Lokalisation der NiV-Proteine in infizierten polarisierten MDCK Zellen	54
3.2.2.	IF-Färbung zum Nachweis der Glykoprotein-Expression in stabil transfizierten nicht-polaren Zellen	55
3.2.3.	IF-Färbung von polarisierten MDCK-Zellen zur Untersuchung der Lokalisation der NiV Glykoproteine mittels konfokaler Mikroskopie	56
3.2.4.	IF-Färbung zur Untersuchung endogener Adaptorprotein(AP)- Komplexe in Vero- und MDCK-Zellen	56
3.2.5.	IF-Färbung zur Untersuchung transient exprimierter AP-Komplexe mit einem c-terminalen Flag-tag in Vero- und MDCK-Zellen	57
3.3.	Etablierung eines Fusions-Assays zum Nachweis des Einflusses der basolateralen Expression der NiV Glykoproteine in polaren MDCK-Zellen	58
3.3.1.	Fusions-Assay in nicht-polaren MDCK-Zellen	58

3.3.2.	Fusions-Assays in polarisierten MDCK-Zellen	59
V.	Ergebnisse	61
1.	Infektion von polarisierten MDCK-Zellen	61
1.1.	Untersuchung NiV-infizierter MDCK-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse	61
1.2.	Verteilung der NiV-Glykoproteine in infizierten MDCK-Zellen	65
2.	Polarität der NiV-Glykoproteine in transient und stabil transfizierten MDCK-Zellen	66
2.1.	Transiente Expression der NiV-Glykoproteine in polarisierten MDCK-Zellen	67
2.2.	Erzeugung stabil exprimierender MDCK-Zellen durch Lipofektion	69
2.3.	Herstellung stabil exprimierender MDCK-Zellen durch retrovirale Pseudotypen	70
2.4.	Verteilung von NiV F und G in stabil exprimierenden MDCK-Zellen	72
2.5.	Einfluss der Mutation in potentiellen Sortierungssignalen auf die basolaterale Verteilung der NiV-Glykoproteine in polarisierten MDCK-Zellen	74
2.5.1.	Verteilung der mutierten NiV-Glykoproteine auf der Oberfläche polarisierter MDCK-Zellen	75
2.5.2.	Fusionsaktivität der wildtypischen und mutierten NiV-Glykoproteine in polarisierten und unpolarisierten MDCK-Zellen	78
3.	Rolle der Adaptorprotein(AP)-Komplexe beim basolateralen Transport der NiV-Glykoproteine in MDCK-Zellen	82
3.1.	Untersuchung endogenen Adaptorprotein(AP)-Komplexe in MDCK-Zellen durch Immunfluoreszenzanalyse	83
3.2.	Interaktion transient exprimierter μ -Untereinheiten der AP-Komplexe mit wildtypischen NiV-Glykoproteinen durch Koimmunfluoreszenz analyse	84
3.3.	Untersuchung der Interaktion stabil exprimierter μ -Untereinheiten der AP-Komplexe mit den wildtypischen NiV-Glykoproteinen durch Koimmunfluoreszenzanalyse	87
3.4.	Untersuchung der Interaktion von endogenen AP-Komplexe und den wildtypischen NiV-Glykoproteinen in Vero-Zellen mittels Koimmunfluoreszenzanalyse	89
VI.	Diskussion	93
VII.	Literaturverzeichnis	109
VIII.	Anhang	121

I. Summary

The highly pathogenic Nipah virus (NiV) is aeriually transmitted and replicates initially in polarized epithelial cells of the respiratory tract. Subsequently NiV spreads systemically, with extensive endothelial involvement leading to vasculitis, which is mostly responsible for the clinical disease. In pigs and in about half of human infections symptomatic respiratory illness is also observed.^(27, 87, 100, 119) It is assumed that the patients with symptomatic respiratory tract infections were responsible for human-to-human transmission.⁽⁸⁷⁾ Thus, NiV infection of the airway mucosa is relevant not only for primary NiV infection, serving as a portal of virus entry, but also for virus shedding and transmission to other hosts. Beside respiratory epithelia, epithelial cells in the kidney and bladder have been shown to be infected *in vivo* and are suggested to be important sites of release of progeny virions into the urine.^(26, 91, 98, 109, 162)

The aim of this study was to elucidate the molecular mechanisms of NiV spread within epithelial cells, focusing on the roles of the two surface glycoproteins G and F. Preliminary analysis showed the both glycoproteins are expressed at the basolateral surface of polarized MDCK cells.⁽¹⁵⁰⁾ It is known that basolateral expression of viral glycoproteins in polarized cells can mediate cell-to-cell fusion and therefore disruption of the epithelial barrier *in vivo*. In this study it could be shown that NiV infection of polarized MDCK cells leads to the formation of viral foci. The finding that both NiV glycoproteins are not only apically expressed but also at lateral membranes in infected cells adjacent to noninfected cells suggests that the infection spreads by cell-to-cell fusion. Supporting this idea basolateral targeting signals were identified in the cytoplasmic domains of both NiV glycoproteins. Tyrosine 525 in the F protein is part of an endocytosis signal⁽¹⁵¹⁾ and is also responsible for basolateral sorting. Surprisingly, a dityrosine motif at position 28/29 in the G protein was identified to mediate polarized targeting. A dileucine motif predicted to function as sorting signal is not involved. Mutation of the targeting signal in one of the NiV glycoproteins prevented the fusion of polarized cells, suggesting that basolateral or bipolar F and G expression facilitates the spread of NiV within epithelial cell monolayers, thereby contributing to efficient

virus spread in mucosal surfaces in early and late phases of infection. To elucidate the molecular mechanisms of the basolateral transport colocalization and Yeast Two-Hybrid studies with adaptor protein (AP) complexes were performed. The results indicate that AP-1B seems to be involved in basolateral sorting of NiV F and AP-4 may play a role for polarized targeting of NiV G.

II. Einleitung

1. Das Nipahvirus (NiV)

1.1. Taxonomie

Zusammen mit dem Hendravirus HeV bildet das hochpathogene NiV das Genus der Henipaviren innerhalb der Familie der *Paramyxoviridae* (Tab. II.1.).⁽¹⁵⁶⁾ Paramyxoviren besitzen ein einzelsträngiges, nicht segmentiertes RNA-Genom in negativer Orientierung und sind umhüllt. Aufgrund dieser Eigenschaften werden die *Paramyxoviridae* zusammen mit den Filo-, Rhabdo- und Bornaviren zur Ordnung der *Mononegavirales* zusammengefasst.⁽¹²¹⁾

Unterfamilie	Genus	charakteristische Vertreter
Paramyxovirinae	Respirovirus	Humane Parainfluenzaviren (HPIV) Typ 1 und 3 Sendai Virus (SeV)
	Rubulavirus	Mumpsvirus (MuV) Simian Virus 5 (SV5) Humane Parainfluenzaviren (HPIV) Typ 2 und 3
	Avulavirus	Newcastle Disease Virus (NDV)
	Morbillivirus	Masernvirus (MV) Hundestaupavirus (CDV) Rinderpestvirus (RPV)
	Henipavirus	Nipahvirus (NiV) Hendravirus (HeV)
	Pneumovirinae	Pneumovirus
Metapneumovirus		humanes Metapneumovirus (HMPV)

Tab. II.1: Charakteristische Vertreter der Paramyxoviridae.

1.2. Epidemiologie

Zwischen Herbst 1998 und Frühjahr 1999 kam es in Malaysia und Singapur zum Ausbruch schwerer, fiebriger Enzephalitiden beim Menschen. Anfänglich wurde das Japanische Enzephalitis Virus (JEV) für die Ausbrüche verantwortlich gemacht. Eine Ausbreitung der Erkrankung konnte jedoch weder durch Eindämmung der als Überträger bekannten Moskitos, noch durch Vakzinierung gegen JEV verhindert werden. Die Beobachtung, dass sich hauptsächlich Schweinezüchter und Mitarbeiter von Schlachtbetrieben infizierten⁽²⁷⁾ und dass es scheinbar direkte Zusammenhänge zwischen Schweinetransporten und dem Auftreten der Erkrankung gab,⁽¹⁶³⁾ sprach ebenfalls gegen diese Theorie. Im März 1999 konnte schließlich der ursächliche Erreger, das Nipavirus identifiziert werden. Benannt wurde das bis dahin unbekannte Paramyxovirus nach dem Dorf *Kampung Sungai Nipah*, aus dem das erste Patientenisolat stammte. Ultrastrukturell, antigenisch und molekular wies NiV Ähnlichkeit zu dem 1994 in Australien identifizierten Hendravirus (HeV) auf.^(26, 156) Während des ersten NiV-Ausbruches in Malaysia wurden 265 erkrankte Personen gemeldet, wovon 105 an den Folgen der Infektion verstarben (Mortalitätsrate ~40 %).^(19, 163) Hier wurde das NiV primär von Schweinen auf den Menschen übertragen, wobei die Aufnahme des Virus vermutlich durch Kontakt mit tierischen Ausscheidungen über Aerosole stattfand.^(26, 118) Untersuchungen deuten darauf hin, dass das NiV bereits seit 1996 für Infektionen von Schweinen in Malaysia verantwortlich war und über Viehtransporte nach Singapur gelangt ist.⁽¹⁴⁷⁾

Das natürliche Reservoir des NiV stellen Flughunde der Gattung *Pteropus* dar (Abb. II.1.), die jedoch bei einer Infektion keine Krankheitssymptome ausbilden, sondern das Virus lediglich übertragen.⁽¹⁶⁵⁾ Das Virus konnte aus Flughundpopulationen in Kambodscha, Indien, Thailand und mittlerweile auch Afrika isoliert und die virale RNA bzw. Antikörper gegen Henipaviren nachgewiesen werden (Verbreitung siehe Abb. II.2.).^(37, 43, 125, 153)



Abb. II.1.: Der natürliche Wirt. Der Flughund der Gattung *Pteropus* stellt das natürliche Reservoir des NiV dar. Quelle: http://commons.wikimedia.org/wiki/File:Pteropus_giganteus_fg01.JPG (Fritz Geller-Grimm)

Die Übertragung des NiV beim ersten Ausbruch 1998/99 in Malaysia ist vermutlich Folge menschlicher Eingriffe in den natürlichen Lebensraum der Flughunde, wodurch die Schweinezucht in unmittelbare Nähe der Nistplätze gelangte und es zur Infektion von Schweinen kommen konnte. Vermutlich infizieren sich die Schweine über den Kontakt mit den Ausscheidungen der Flughunde bzw. über angefressene, kontaminierte Früchte. Innerhalb der Schweinepopulation breitete sich das NiV sehr schnell aus, da die beengte Haltung optimale Bedingungen für die Verbreitung bot und NiV-infizierte Schweine hoch kontagiös sind.⁽⁴⁵⁾ Um eine weitere Ausbreitung der Krankheit zu verhindern, wurde in den betroffenen Gebieten eine Notschlachtung von über einer Million Schweinen durchgeführt.⁽¹⁹⁾ Neben dem Menschen, Schweinen und Flughunden können auch Hunde, Katzen, Pferde, Meerschweinchen, Hamster und Frettchen durch das Virus infiziert werden.^(26, 65, 98, 161, 167)

Seit 2001 kam es in Nordindien^(21, 62, 85) und Bangladesch^(42, 66, 85, 88) immer wieder zu Ausbrüchen NiV-induzierter Erkrankungen mit tödlichen Enzephalitiden beim Menschen. In diesen Fällen stieg die Mortalitätsrate im Vergleich zum initialen Ausbruch auf 67 bis 92 %. Hierbei wurde das Virus direkt von Flughunden auf den Menschen übertragen. Außerdem wurden Mensch-zu-Mensch Übertragungen beobachtet.^(57, 66, 87, 88)

Da das NiV im Menschen zu einer hohen Mortalität führt und es bislang keine Therapie oder Vakzine gibt, wurde das NiV als hochpathogenes Virus der Sicherheitsstufe 4 (BSL-4) eingestuft.

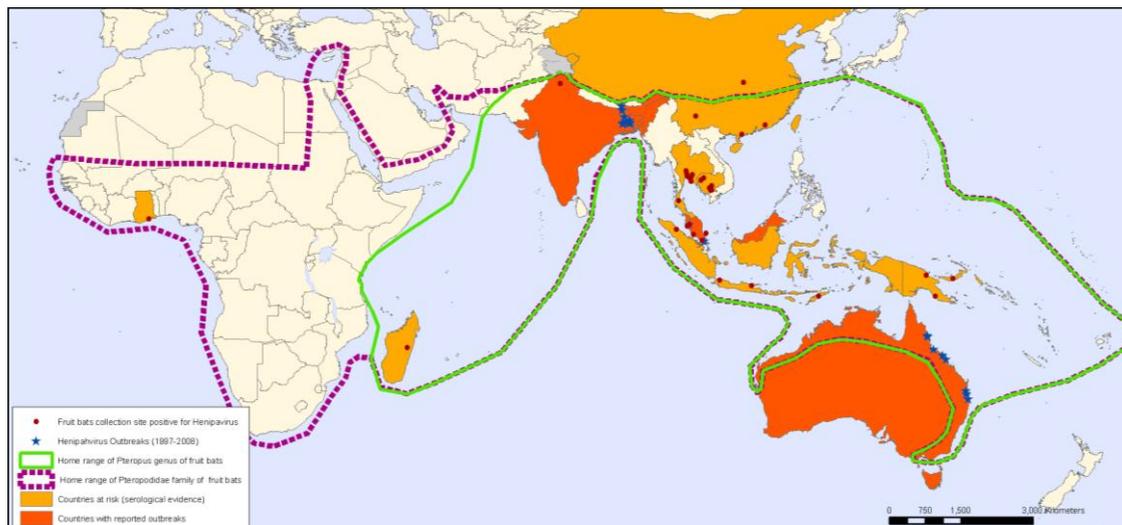


Abb. II.2.: Die geographische Verbreitung des natürlichen Wirtes sowie die Verteilung der Henipaviren. : Henipavirus-Risikogebiete, : Gebiete mit Henipavirus-Ausbrüchen, ● : Orte Henipavirus-induzierter Erkrankungen, ★ : Fundorte Henipavirus-positiver Flughunde, : Verbreitungsgebiet der Gattung Pteropus, : Verbreitungsgebiet der verwandte Art Eidolon, Quelle: <http://www.who.int/csr/disease/nipah/en/index.html>

1.3. Klinik, Pathogenese und Diagnose

Nach einer Inkubationszeit von vier bis 14 Tagen treten zunächst unspezifische, grippeähnliche Symptome wie Fieber, Halsschmerzen, Muskelschmerzen (Myalgie), Erbrechen und Kopfschmerzen bis hin zu Bewusstseinsstörungen auf. Klinische Anzeichen der folgenden Enzephalitis reichen von segmentaler Myoklonie, Hypertonie, Tachykardie, Areflexie und Hypotonie und führen zumeist zum Koma.⁽¹⁶³⁾

Die Mortalitätsrate bei NiV Infektionen liegt zwischen 40 und 92 %, wobei es bei 15 % der nicht lethalen Krankheitsverläufe zu bleibenden neurologischen Schäden kommt. Es konnten außerdem sogenannte Rückfall- oder *relapse*-Enzephalitiden, sowie *late-onset*-Enzephalitiden nach asymptomatischem Infektionsverlauf beobachtet werden.^(147, 162) Diese Beobachtungen sprechen dafür, dass das Virus im zentralen Nervensystem (ZNS) persistiert. Der Zeitraum zwischen Erkrankung und Wiederausbruch beträgt im Schnitt 8,4 Monate.⁽¹⁴⁷⁾ Die Mortalitätsrate lag bei den später auftretenden Enzephalitiden mit 18 % deutlich unter der von akuten Enzephalitiden.⁽⁸⁵⁾ Neueste Untersuchungen im Hamstermodell haben gezeigt, dass der Verlauf und die

Schwere der Erkrankung erheblich von der Dosis der Infektion abhängen. Werden die Hamster mit einer geringen Dosis infiziert, bilden sie hauptsächlich neurologische Erkrankungen verbunden mit einer systemischen Infektion aus. Im Gegensatz dazu führte die Infektion mit einer hohen Dosis zu einer starken respiratorischen Erkrankung mit einer schwachen systemische Ausbreitung.⁽¹²⁷⁾

Histopathologische und immunhistochemische Untersuchungen deuten darauf hin, dass das NiV zunächst im Respirationstrakt repliziert. Der initialen Replikation folgend bildet sich eine systemische Infektion des Endothels kleiner und mittlerer Gefäße aus, die im ZNS am stärksten ausgeprägt ist. Aber auch die Lunge, das Herz und die Nieren, jedoch nicht die Leber sind infiziert.⁽¹⁶³⁾ Neben einer generellen Vaskulitis lassen sich, wie für Paramyxoviren typisch, mehrkernige Riesenzellen (Synzytien), die durch virusinduzierte Zell-Zell-Fusion des Endothels hervorgerufen werden, beobachten. Wenn sich die fusionierten Endothelzellen aus dem Zellverband lösen und in das Gefäßlumen gelangen, können zudem leichte Thrombosen entstehen.⁽²⁶⁾ Im ZNS, dem Hauptort der Endothelinfektion, beobachtet man eine diffuse Vaskulitis im zerebralen Kortex sowie im Hirnstamm mit Ausbreitung in das parenchymale Gewebe, wo extensive lytische Nekrosen (Plaques) vorgefunden werden.^(25, 26, 162) Fokale Ischämien oder Infarkte im Gehirn, die durch Synzytienbildung im mikrovaskulären Endothel Nekrosen und vaskuläre Entzündungen hervorrufen, sowie die Infektion von Neuronen führen vermutlich zu den auftretenden neurologischen Ausfällen.^(27, 79)

Während des ersten Ausbruchs wurde zur Diagnose mangels eines spezifischen Tests auf ELISA (*Enzyme Linked Immunosorbent Assay*) zurückgegriffen, der IgM und IgG des nah verwandten HeV detektieren konnte. Nach der Entwicklung NiV-spezifischer ELISA wurde im Falle eines zweifelhaften Ergebnisses eine Probe der Cerebrospinalflüssigkeit (CSF) anhand des Elektronenmikroskops auf die Anwesenheit von NiV analysiert.⁽²⁴⁾ Zur Untersuchung von Gewebeproben infizierter Menschen oder Tiere wurden immunhistochemische Methoden verwendet.⁽²⁶⁾ Nach der vollständigen molekularen Charakterisierung der beiden NiV-Stämme Malaysia und Bangladesch war es möglich, virale RNA aus Serum, Urin und CSF durch RT-PCR zu detektieren.^(1, 55, 152) Die Herstellung von monoklonalen Antikörpern und rekombinanten NiV-Antigenen für

ELISA haben einen weiteren Fortschritt für die Entwicklung spezifischer Diagnosemethoden gebracht.⁽⁸⁵⁾ In den letzten Jahren wurden außerdem Serumneutralisationstests (SNT) entwickelt, die auf Vesikulären Stomatitis Virus (VSV)-Pseudotypen basieren und somit eine Handhabung ohne NiV und des BSL-4-Bereiches ermöglichen.^(71, 146)

1.4. Prophylaxe und Therapie

Im Moment steht eine Prophylaxe in Form einer Vakzine für den Menschen noch nicht zur Verfügung. Es konnte im Tiermodell jedoch gezeigt werden, dass eine Immunisierung mit den NiV Oberflächenglykoproteinen einen Schutz gegen die Infektion hervorrufen kann. Mäuse, die mit einem rekombinanten Vacciniavirus, das die NiV-Hüllproteine exprimiert, immunisiert wurden, bildeten fusionshemmende und neutralisierende Antikörper.⁽¹⁴⁵⁾ Katzen konnten durch Gabe löslicher HeV- oder NiV-Glykoproteine vor einer Virusinfektion geschützt werden.⁽¹⁰⁸⁾ Wurden die Tiere mit löslichen HeV-Glykoproteinen und zusätzlich mit Adjuvanz behandelt, wurde eine noch deutlichere Immunantwort nachgewiesen, die zu einer IgG-, IgM, und IgA-vermittelten Immunität sowohl gegen HeV, als auch gegen NiV führte.⁽⁹⁶⁾ Des Weiteren konnten Schweine unter Verwendung eines rekombinanten, für NiV F und G kodierenden Canarypox-Vektors immunisiert werden. Hier konnte sowohl die Replikation als auch die Freisetzung der Viren über die Schleimhäute verhindert werden.⁽¹⁵⁷⁾ Aktuelle Studien zeigen, dass Virus-ähnliche Partikel (*virus like particles*, VLPs) bestehend aus den beiden Glykoproteinen F und G und dem Matrixprotein zumindest *in vitro* die angeborene Immunabwehr der Zellen aktivieren und somit einen vielversprechenden Ansatz für einen Impfstoff bieten könnten.⁽¹⁵⁴⁾ In der Vergangenheit wurden aufgrund eines fehlenden geeigneten Impfstoffes Schweine in den Risikogebieten zur Vorbeugung erneuter Ausbrüche in regelmäßigen Abständen auf NiV-Antikörper getestet. Die Weltgesundheitsorganisation (WHO) berichtet, dass heutzutage regelmäßige Reinigungen und Desinfektionen der Schweinefarmen mit Natirumhypochlorid und ähnlichen Mitteln zur Vorbeugung von Infektionen ausreichen. Im Fall von

Infektionen sollen die Farmen sofort unter Quarantäne gestellt werden und die Schweine unter kontrollierten Bedingungen getötet und verbrannt oder beerdigt werden, damit das Risiko einer Übertagung auf den Menschen minimiert wird.

Eine antivirale Therapie gegen NiV gibt es zum jetzigen Zeitpunkt noch nicht. Eine Reihe möglicher Ansätze wurde jedoch beschrieben. So konnte zum Beispiel die Gabe des Basenanalogen Ribavirin die Mortalitätsrate um bis zu 36 % senken.⁽²³⁾ Im Hamstermodell konnten Ribavirin und OMP-Decarboxylase-Inhibitoren eine NiV-Infektion abschwächen, aber nicht verhindern, während in fünf von sechs Fällen Interferon-induzierendes poly(I)-poly(C₁₂U) den letalen Verlauf der Infektion verhinderte.⁽⁵³⁾ In *in vitro* Experimenten führte die Gabe von Peptiden, die den C-terminalen *heptad repeats* der Fusionsproteine von NiV und HeV entsprechen, zur Inhibition der Zell-Zell-Fusion und stellt somit einen weiteren möglichen Therapieansatz dar.⁽¹³⁾

Im Frettchenmodell führte die Gabe von humanen monoklonalen Antikörpern gegen das NiV F- oder G-Protein zum Schutz vor einer Infektion mit NiV.^(54, 167, 168) Hierbei hatte die Gabe von gegen das G Protein gerichteten monoklonalen Antikörpern ein höheres Potential eine NiV-Infektion zu verhindern als Antikörper gegen das F-Protein. Diese monoklonalen Antikörper könnten zusätzlich in der Prophylaxe sowie in der Diagnose Verwendung finden.^(15, 168, 169)

Einen weiteren Therapieansatz könnte die Behandlung mit *small interfering* RNAs (siRNAs), die die Genexpression homologer mRNAs inhibieren, die für die viralen Proteine kodieren, darstellen. Im Minigenom-Replikationssystem konnte gezeigt werden, dass verschiedene siRNAs, die gegen das Gen der Polymerase L gerichtet waren, die Replikation inhibieren konnten. Einen Einfluss auf die Replikation während einer Infektion mit NiV *in vitro* übte hingegen eine gegen das Gen des Nukleoproteins N gerichtete siRNA aus.⁽¹¹⁰⁾

1.5. Virusaufbau

Das NiV ist ein pleomorphes, umhülltes Paramyxovirus (Abb. II.3.) mit einer Größe von 40 bis 600nm. Infektiöse Viruspartikel sind zumeist von sphärischer Morphologie, es kommen daneben manchmal aber auch filamentöse Partikel vor.⁽²⁶⁾ In die von der Wirtszelle abstammende Hüllmembran sind die Oberflächenglykoproteine, das rezeptorbindende Glykoprotein G und das fusionsvermittelnde Glykoprotein F, integriert. Im Inneren des Virions befindet sich das einzelsträngige, nichtsegmentierte RNA-Genom, welches komplexiert mit dem Nukleoprotein (N), dem Phosphoprotein (P) und der Polymerase (L) als helikales Nukleokapsid vorliegt. Über das Matrixprotein (M) interagiert das Nukleokapsid mit den beiden Oberflächenglykoproteinen und somit mit der Virushülle.

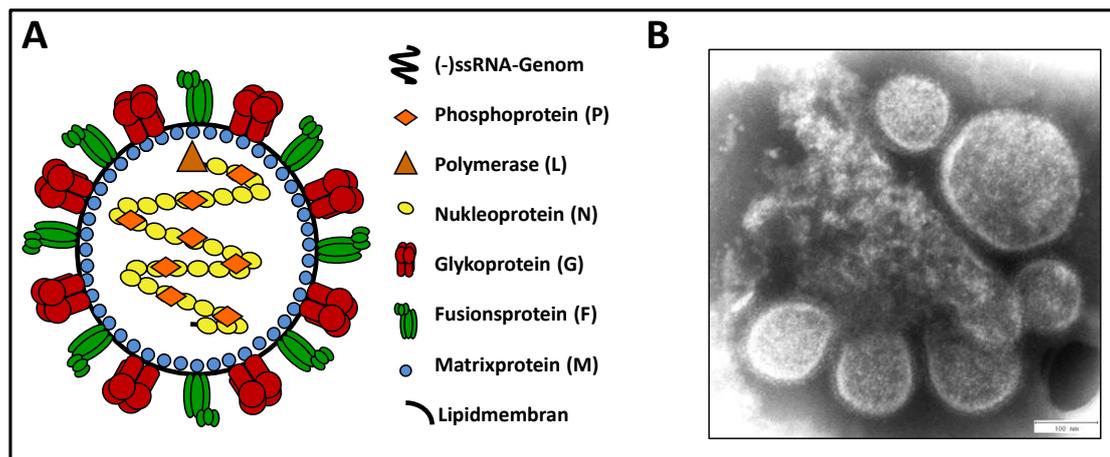


Abb. II.3.: Struktur des Nipahvirus. (A) Schematische Darstellung des Nipahvirus (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von Nipahvirus-Partikeln aus dem Überstand infizierter Vero-Zellen (Aufnahme von Dr. L. Kolesnikova)

1.5.1. Genomaufbau und Replikation

Das NiV besitzt ein einzelsträngiges, nicht-segmentiertes RNA-Genom in negativer Orientierung, welches mit 18246 Basen deutlich länger ist als das anderer Paramyxoviren. Es folgt der *rule of six*, was bedeutet, dass die Anzahl der Basen durch sechs teilbar ist. Dies ist für die Replikation von entscheidender Bedeutung, denn jedes

Nukleoprotein-Monomer ist mit sechs Nukleotiden assoziiert⁽³⁹⁾ und die Aktivität des Promotors am 3'-Ende des Genoms ist von der relativen Lage zu den N-Monomeren abhängig.⁽⁵⁹⁾ Somit sind 3041 Nukleoproteine mit der viralen RNA assoziiert und bieten Schutz vor zellulären Nukleasen. Der Aufbau des Genoms entspricht dem anderer Paramyxoviren (Abb. II.4.). Das Genom besitzt an seinem 3'-Ende eine *leader*- und an seinem 5'-Ende eine *trailer*-Sequenz. Beide kodieren nicht für Aminosäuren, spielen aber eine Rolle bei der Transkription und Replikation. In 3'-5'-Richtung folgen die für die entsprechenden viralen Proteine kodierenden Gene in der Reihenfolge N-P-M-F-G-L. Die Gene sind von nichtkodierenden, sogenannten intergenischen Regionen unterbrochen, welche bei den Henipaviren hoch konserviert sind.⁽¹⁵⁶⁾ Am 5'-Ende befindet sich eine *trailer*-Sequenz, die cis-aktive Initiationssignale für den Start der Synthese neuer Virusgenome, sowie Verpackungssignale für die RNA während des Viruszusammenbaus (*Assembly*) enthält.⁽⁹⁹⁾

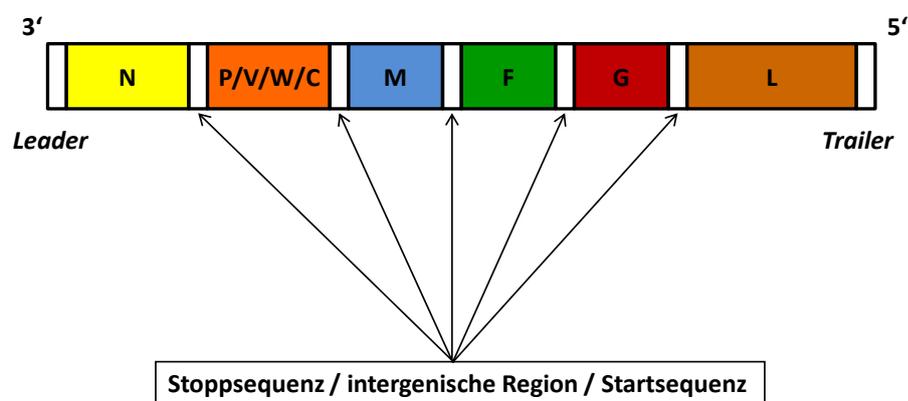


Abb. II.4.: Genomorganisation der Nipahviren. N: Nukleoprotein; P: Phosphoprotein; M: Matrixprotein; F: Fusionsprotein; G: Glykoprotein; L: Polymerase; V/W/C: Nichtstrukturproteine (nach Harcourt⁽⁶¹⁾)

Im Wesentlichen verläuft die Replikation des NiV wie bei den anderen Paramyxoviren auch (Abb. II.5).⁽⁵⁹⁾ Sie beginnt mit der spezifischen Bindung des NiV G-Proteins an einen der beiden zellulären Rezeptoren EphrinB2 oder EphrinB3. Nach pH-unabhängiger, F-Protein vermittelter Fusion der Virushülle mit der Wirtsmembran⁽¹⁴⁵⁾ wird das Nukleokapsid ins Zytoplasma der Zelle entlassen, wo die Replikation stattfindet.

II. Einleitung

Zunächst werden die viralen Gene durch die virale Polymerase L in mRNA umgeschrieben. Dazu bindet der Komplex aus der RNA-Polymerase L, dem N- und dem P-Protein an den Promotor in der 3'-*leader*-Sequenz und synthetisiert eine kurze *leader*-mRNA, deren Funktion derzeit noch nicht geklärt ist. Die Polymerase transkribiert nacheinander die Gene für N, P, M, F, G und L, wobei sie nach jeder Transkriptionseinheit stoppt, die intergenische Region überliest und am 3'-Ende des folgenden Genes wieder mit der Synthese beginnt. Diese Wiederaufnahme der Transkription am nächsten Gen findet nicht immer erfolgreich statt, da der Polymerasekomplex von der RNA "abfallen" kann und die Transkription erneut vom Promotor am 3'-Ende aufgenommen werden muss. Daher entsteht mit der Zeit ein Transkriptionsgradient vom N- zum L-Gen.⁽¹⁵⁸⁾ Dementsprechend gibt es vom N-Protein am meisten und von der Polymerase L am wenigsten mRNA, was sich auch in der Proteinmenge widerspiegelt.

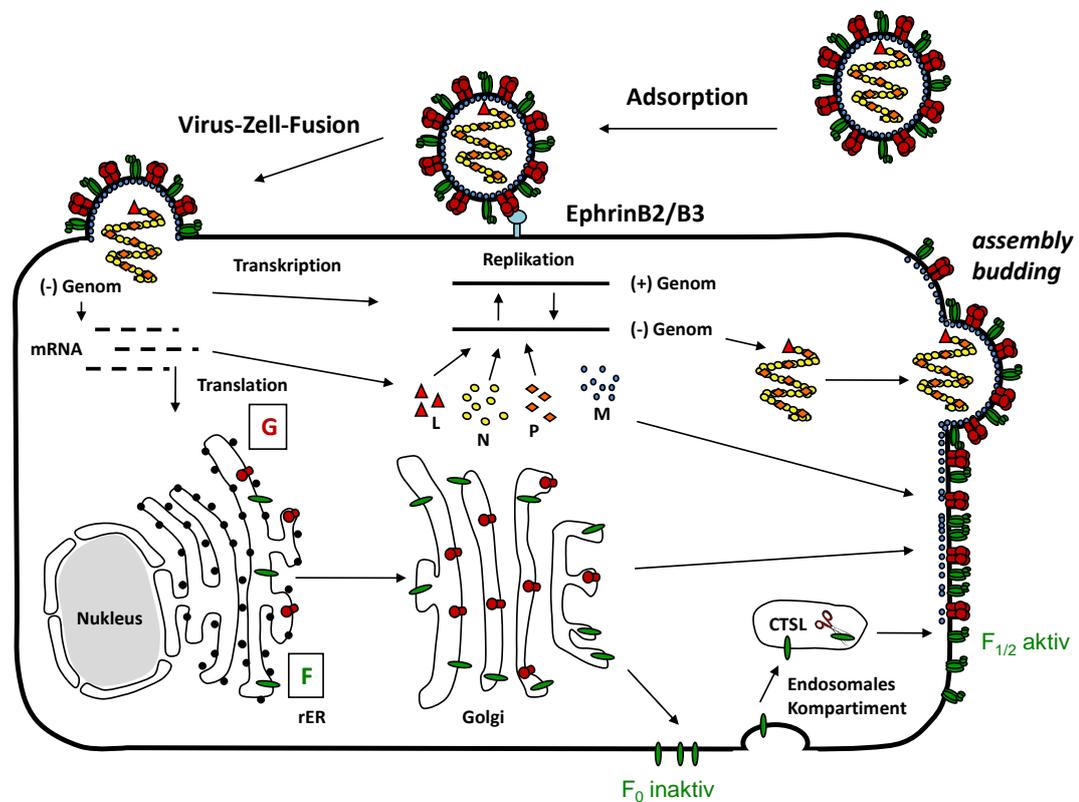


Abb. II.5.: Schematische Darstellung des Replikationszyklus von NiV.

Die mRNAs der Oberflächenglykoproteine F und G werden an den Ribosomen des rauen endoplasmatischen Retikulums (rER) translatiert und über den sekretorischen Transportweg zur Plasmamembran transportiert, wobei sie glykosyliert werden. Das auf der Zelloberfläche zunächst als inaktiver Vorläufer vorliegende F-Protein wird mittels Clathrin-vermittelter Endozytose internalisiert, im endosomalen Kompartiment durch die Protease Cathepsin L proteolytisch aktiviert und dann zurück zur Zelloberfläche transportiert.^(34-36, 117, 151) Die Synthese der NiV-Proteine N, P, M und L findet an freien Ribosomen im Zytoplasma der Zelle statt. Sie werden von dort aus an die Plasmamembran transportiert. Sobald eine gewisse Menge an N-Protein synthetisiert wurde, wechselt die Polymerase von der Transkription auf die Replikation viraler Genome. Das N-Protein dient hierbei als Antiterminator und zwingt die Polymerase zum Ablesen der intergenischen Regionen. Somit entsteht eine durchgängige Plusstrang-RNA (Antigenom), die als Matrize für die Synthese neuer RNA-Genome negativer Orientierung dient. Das neu gebildete RNA-Genom wird durch N-Proteine enkapsidiert und es werden neue Ribonukleoproteinkomplexe gebildet. Beim anschließenden *Assembly* der Viren an der Plasmamembran vermittelt das M-Protein durch die Interaktion mit dem Nukleokapsid und den zytoplasmatischen Domänen der Glykoproteine den Zusammenbau der Viruspartikel. Anschließend werden die neu entstandenen Viren freigesetzt (*budding*).⁽⁹⁹⁾

1.5.2. Die viralen Glykoproteine

Beide NiV Oberflächenglykoproteine F und G (Abb. II.6.) sind für den Viruseintritt von entscheidender Bedeutung, da sie zum einen die Adsorption des Virus an die Wirtszelle und zum anderen die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran vermitteln.

1.5.2.1. Das Fusionsprotein (F)

Das Fusionsprotein F (Abb. II.6.B) besteht aus 546 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von 60 kDa. Es ist ein Typ I-Membranprotein und liegt auf der Oberfläche von infizierten Zellen wie andere paramyxovirale F-Proteine vermutlich als Trimer vor.⁽⁶¹⁾

Die C-terminale zytoplasmatische Domäne des F-Proteins besteht aus 28 Aminosäuren,⁽⁶¹⁾ gefolgt von der Transmembrandomäne, die das Protein in der Plasmamembran verankert. Am N-terminalen Ende der F₁-Untereinheit befindet sich das Fusionspeptid, welches aus einer Folge von 20 hydrophoben Aminosäuren besteht. Das Fusionspeptid ist sowohl für die Virus-Zell-Fusion, als auch für die Zell-Zell-Fusion von entscheidender Bedeutung, da es während des Fusionsprozesses in die Zellmembran inseriert.⁽⁷⁷⁾ Während des Fusionsprozesses sind außerdem zwei α -helikale Domänen in der F₁-Untereinheit, die sogenannten *heptad repeats* von entscheidender Bedeutung, denn diese interagieren miteinander und bilden *coiled-coiled*-Bündel, die durch ein Wegklappen nach außen zur Verschmelzung der Membranen führen.⁽¹⁴⁰⁾

Das F-Protein besitzt fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen die Glykosylierungsstellen N67 und N99 in der F₂-Untereinheit und N414 und N464 in der F₁-Untereinheit genutzt werden.⁽¹⁰²⁾ Die N-Glykosylierung des F-Proteins ist unter anderem wichtig für die Verbindung zwischen dem F- und G-Protein und beeinflusst die Fusionsseigenschaften des Glykoprotein-Komplexes entscheidend.⁽³⁾

Die proteolytische Aktivierung des Vorläuferproteins F₀ erfolgt an der monobasischen Spaltstelle (Arginin) an Position 109.⁽¹⁰¹⁾ Nach Synthese wird das F-Protein zunächst ungespalten an die Zelloberfläche transportiert. Aufgrund eines klassischen Endozytosesignals der Form YRSL an Position 525-528 kann das Protein durch Clathrin-vermittelte Endozytose aufgenommen werden und trifft im endosomalen Kompartiment auf die Aktivierungsprotease Cathepsin L. Die aktiven Untereinheiten F₁ und F₂, welche durch Disulfidbrücken miteinander verbunden bleiben, werden anschließend zurück zur Zelloberfläche transportiert und in neu entstehende Virionen eingebaut. Diese sind somit infektiös und können neue Zellen durch Fusion der Virushülle mit der Zellmembran infizieren.^(35, 36, 117, 151)

Die zytoplasmatische Domäne des NiV F-Proteins besitzt ein tribasisches KKR-Motiv, welches über *inside-out signaling* die Fusionsaktivität der Ektodomäne beeinflussen kann. Wird das erste Lysin gegen ein Alanin ausgetauscht, steigt die Fusionsaktivität um das 5,5-fache, während eine Mutation des zweiten Lysin oder des Arginin zu einer Reduktion der Fusionsgenität führt (3- bis 5-fach). Begründet liegt diese Hypo- bzw.

Hyperfusionsaktivität darin, dass die Mutationen zu einer veränderten Konformation der Ektodomäne führen, was wiederum zu entweder einer schnelleren oder langsameren Ausbildung der *coiled-coiled*-Bündel und damit verbundenen Fusion führt.⁽²⁾

Das NiV F-Protein ist während der Infektion für zwei Fusionsprozesse wichtig. Zum einen vermittelt es die pH-unabhängige Fusion der Virushülle mit der Zellmembran beim Viruseintritt,⁽⁷⁴⁾ zum anderen spielt es eine entscheidende Rolle bei der Zell-Zell-Fusion infizierter Zellen mit Rezeptor-tragenden benachbarten Zellen. So wird eine Ausbreitung der Infektion ohne vorherige Virusfreisetzung ermöglicht.^(14, 145)

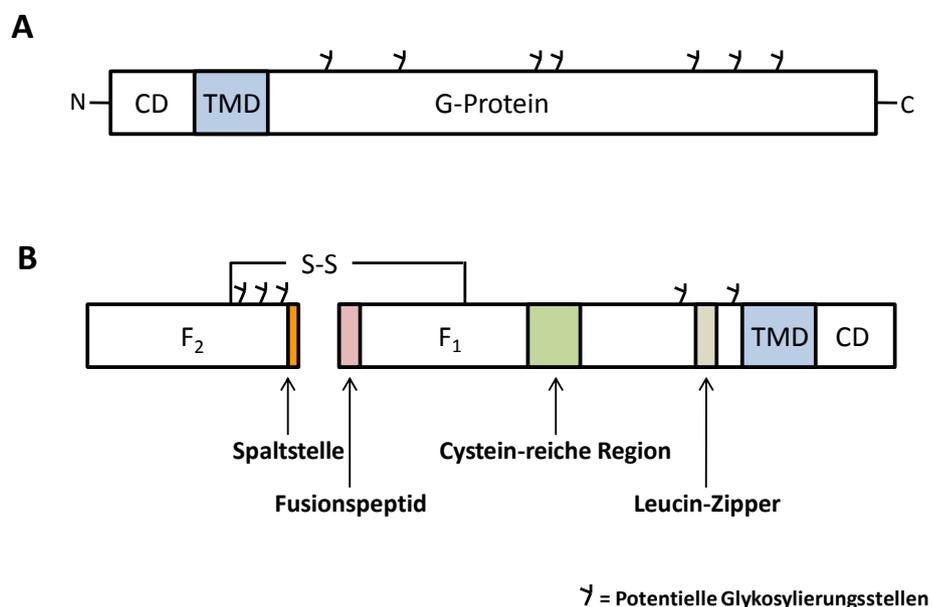


Abb. II.6.: Schematische Darstellung der NiV-Glykoproteine. (A) Das rezeptorbindende G-Protein und (B) das F-Protein in der proteolytisch aktivierten Form TD: Transmembrandomäne, CD: zytoplasmatische Domäne.

1.5.2.2. Das Glykoprotein (G)

Das Glykoprotein G (Abb. II.6.A) besteht aus 602 Aminosäuren, hat ein Molekulargewicht von 67 kDa und enthält sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen.⁽⁶¹⁾ Es ist ein Typ II-Transmembranprotein, das strukturelle Ähnlichkeit zu anderen paramyxoviralen Rezeptor-bindenden Proteinen zeigt. Der N-terminalen, 45 Aminosäuren umfassenden zytoplasmatischen Domäne folgt die Transmembrandomäne, die kurze extrazelluläre Stielregion und die große globuläre Ektodomäne. Das

G-Protein ist über intermolekulare Disulfidbrücken, welche nahe der Transmembrandomäne liegen, zu Dimeren verbunden. Im Viruspartikel und auf der Oberfläche von infizierten Zellen liegen diese Homodimere nichtkovalent zu Tetrameren assoziiert vor.^(16, 164) Wie alle Rezeptor-bindenden Proteine der Paramyxoviren vermittelt das G-Proteine die Adsorption an den NiV-spezifischen zellulären Rezeptor, in diesem Fall EphrinB2/B3^(10, 114, 115, 145) und ist neben dem F-Protein für die Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran unerlässlich.⁽¹⁴⁵⁾ Im Gegensatz zum Hämagglutinin (H) der Morbilliviren und der Hämagglutinin–Neuraminidase (HN) der Paramyxo- und Rubulaviren besitzt das G-Protein weder eine hämagglutinierende noch eine Neuraminidase-Aktivität.⁽¹⁵⁵⁾

2. Polarisierte Epithelzellen

Epithelzellen kleiden die innere und äußere Oberfläche des Körpers aus und erfüllen eine Vielzahl von Aufgaben. Sie dienen dem Schutz vor mechanischen Einflüssen und eindringenden Mikroorganismen, nehmen in Sinnesorganen sensorische Aufgaben wahr oder dienen im Respirations- und Gastrointestinaltrakt zur Adsorption und Sekretion. Je nach Gewebespezifität können Epithelzellen sehr unterschiedliche Formen annehmen. Gemeinsam haben sie jedoch ihre polarisierte Organisationsform, was bedeutet, dass ihre Plasmamembran in eine basolaterale und apikale Membrandomäne unterteilt ist.^(130, 149) Diese zwei Domänen besitzen völlig unterschiedliche Protein- und Lipidkompositionen entsprechend ihrer Aufgaben und Funktionen.^(9, 139) In einlagigen polarisierten Zellschichten (Monolayern) weist die apikale Seite nach außen oder zum Lumen, während die basolaterale Seite im Kontakt mit dem darunterliegenden Gewebe und dem Blutssystem steht. Die Proteine für die epithelspezifischen Aufgaben befinden sich meist auf der apikalen Seite, während Proteine, die für den grundsätzlichen Stoffwechsel benötigt werden, sich hauptsächlich in der basolateralen Membrandomäne befinden. Damit es zu keiner Durchmischung dieser Proteine und Lipide kommt, sind sie durch *tight-* und *adherens junctions*, sowie durch Desmosomen voneinander getrennt.^(94, 129)

Auch in Zellkultur können Epithelzellen einen polarisierten Phänotyp ausbilden. Werden beispielsweise *Madin–Darby canine kidney* (MDCK)–Zellen, eine Epithelzelllinie aus der Niere eines Cockerspaniels,⁽⁸⁰⁾ auf einer permeablen Filtermembran kultiviert, bilden sie einen polarisierten Phänotyp aus. Dieses System bietet also eine gute Möglichkeit zur Untersuchung der Virusinfektion von Epithelzellen sowie gerichteter Transportvorgänge von Proteinen *in vitro*.⁽²⁰⁾

2.1. Gerichteter Proteintransport in polarisierten Epithelzellen

Um die spezifische Zusammensetzung der apikalen und basolateralen Membrandomäne aufrecht zu erhalten, müssen neu synthetisierte Proteine gezielt zu ihrer Zieldomäne transportiert werden.⁽⁹⁷⁾ In allen Zelltypen gibt es für die Sortierung und Verteilung von Proteinen ein hochkomplexes System, welches über die Erkennung spezifischer Signale in den Proteinen funktioniert. In polarisierten Zellen wird neben diesem generellen System ein gerichteter Transport zur apikalen und basolateralen Membrandomäne benötigt. Alle Transmembranproteine werden im ER synthetisiert und gelangen über den Golgi-Apparat zum *trans Golgi* Netzwerk (TGN). Von dort aus können die Proteine unterschiedliche Wege zu den Membrandomänen nutzen (Abb. II.7.). Zum Einen können die Proteine direkt vom TGN aus zur apikalen oder basolateralen Membrandomäne transportiert werden. Zum Anderen können Sie aber auch über das *recycling endosome* (RE) indirekt sortiert werden. Dies kann entweder vom TGN über das RE geschehen oder aber über Endozytose gefolgt von Transzytose von der einen Membrandomäne zur anderen (von apikal nach basolateral oder umgekehrt).^(48, 49, 129, 136) Welcher Weg letztendlich genutzt wird, hängt vom Protein selbst, sowie vom Zelltyp ab. In Hepatozyten beispielsweise scheint der indirekte Weg stärker genutzt zu werden, während für MDCK-Zellen diskutiert wird, dass hier der direkte Weg häufiger genutzt wird.^(94, 107)

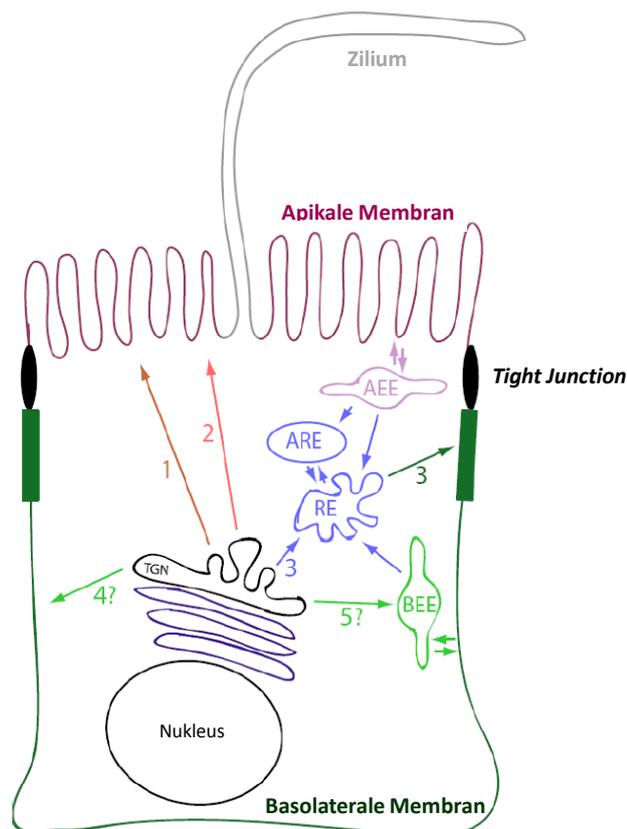


Abb. II.7.: Basolaterale und apikale Transportwege in polarisierten Epithelzellen. Schematische Darstellung der verschiedenen Wege des apikalen oder basolateralen Transportes in polarisierten Epithelzellen. (1) *Raft*-abhängiger und (2) *Raft*-unabhängiger Transport zur apikalen Membran, (3) indirekter und (4) direkter Weg zur basolateralen Membran, (5) direkter Weg zur basolateralen Membran über das *early endosome*. Die Fragezeichen bedeuten, dass diese Wege noch nicht vollständig aufgeklärt sind. AEE = *apical early endosome*, ARE = *apical recycling endosome*, BEE = *basolateral early endosome*, RE = *recycling endosome*, (modifiziert nach Fölsch⁽⁵⁰⁾)

Beim gerichteten Transport zur Plasmamembran spielt neben diesen Mechanismen auch das Zytoskelett und die extrazelluläre Matrix eine Rolle. So wird beispielsweise die Na/K-ATPase in MDCK-Zellen erst zu beiden Membrandomänen transportiert. Die basolateral transportierten Moleküle gehen dann stabile Komplexe mit dem Zytoskelett ein, wohingegen die nicht mit dem Zytokortex komplexierte apikal transportierte Na/K-ATPase endozytiert und zur basolateralen Membrandomäne umsortiert wird.⁽⁶⁰⁾ Für die Sucrose-Isomaltase (SI), die zur apikalen Membrandomäne transportiert wird, wurde gezeigt, dass diese Verteilung aktinabhängig stattfindet.⁽⁶⁸⁾

2.2. Transportsignale von Proteinen in polarisierten Epithelzellen

Der Proteintransport zur apikalen und basolateralen Membrandomäne wird durch spezifische Transportsignale vermittelt. Es wird vermutet, dass apikale und basolaterale Signale um deren Erkennung konkurrieren, wenn sie gleichzeitig vorhanden sind.⁽³¹⁾

2.2.1. Signale für den apikalen Proteintransport

Lipid rafts sind Mikrodomänen bestehend Cholesterol und Sphingolipiden und spielen bei der apikalen Sortierung von Proteinen eine wichtige Rolle.^(134, 138) *Lipid rafts* entstehen am TGN, wo die Proteine mit diesen *rafts* interagieren und in apikale Vesikel verpackt werden. Diese Interaktion kann, wie beispielsweise für das Influenza Hämagglutinin beschrieben, über die Transmembrandomäne der Proteine oder über sogenannte Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol (GPI)-Anker geschehen. Mutiert man die zytoplasmatische Domäne basolateral transportierter Proteine dahingehend, dass sie einen GPI-Anker kovalent binden können, werden diese Proteine statt zur basolateralen zur apikalen Membrandomäne transportiert.^(18, 84, 89) Ebenfalls für den apikalen Transport verantwortlich können *N*- und *O*-Glykane sein.^(120, 132) Diese können mit Lektinen interagieren, welche die glykosylierten Proteine in spezifische apikale Vesikel verpacken.⁽⁴⁰⁾ Es ist aber auch denkbar, dass sie eher indirekt auf den apikalen Transport einwirken, indem sie für die korrekte Faltung eines Proteins sorgen und somit das apikale Sortierungssignal in der Proteinsequenz für die zelluläre Sortiermaschine besser zugänglich machen.⁽¹²⁸⁾ Eine gewisse Funktion beim apikalen Transport wird auch den Motorproteinen zugeschrieben. So ist beispielsweise bekannt, dass die zytoplasmatische Domäne von Rhodopsin mit Dynein, einem Mikrotubuli-Motorprotein, interagiert und dadurch zur apikalen Plasmamembran transportiert wird.⁽¹⁴⁴⁾

2.2.2. Signale für den basolateralen Proteintransport

Die Information für die basolaterale Sortierung befindet sich meist in Form kleiner Peptidmotive in der zytoplasmatischen Domäne dieser Proteine. Meist sind diese

Signale von einer aromatischen Aminosäure, in der Regel einem Tyrosin (Y), abhängig. Dieses Tyrosin befindet sich häufig im Motiv YXXØ, wobei das X jede beliebige und das Ø eine hydrophobe Aminosäure darstellt. Dieses Motiv wird häufig ebenfalls für die Clathrin-vermittelte Endozytose genutzt.^(12, 94) Für eine Reihe zellulärer Proteine (z.B. *low-density lipoprotein* (LDL)-Rezeptor⁽⁴⁶⁾) konnte bereits gezeigt werden, dass YXXØ-Motive für den basolateralen Transport verantwortlich sind. Auch für einige virale Glykoproteine ist bekannt, dass die gezielte basolaterale Verteilung von diesem Motiv abhängig ist. Dies gilt zum Beispiel für das gp160 des HIV.⁽⁸⁶⁾ Ein weiteres Beispiel ist das F-Protein des Masernvirus (MV). Dies besitzt mit seiner YVRSL-Sequenz ein degeneriertes YXXØ-Motiv für den basolateralen Transport und die Endozytose.⁽¹⁰³⁾ Ähnliches gilt auch für das Glykoprotein des VSV mit dem Unterschied, dass das YXXØ-Motiv hier keine Funktion bei der Endozytose hat.⁽¹⁴⁸⁾

Neben diesen klassischen YXXØ-Motiven gibt es noch ein weiteres Tyrosin-abhängiges Motiv für den basolateralen Transport: NPXY (N steht für Asparagin und P für Prolin).⁽¹²⁶⁾ Aber nicht alle Transportsignale sind abhängig von einer aromatischen Aminosäure. So gibt es außerdem Signale, die aus zwei hydrophoben Aminosäuren bestehen. Häufig sind es zwei Leucine (Di-Leucin-Motiv), die den basolateralen Transport vermitteln. Dies konnte beispielsweise für den *mouse macrophage Fc receptor* (FcRII-B2),⁽⁶⁷⁾ sowie für viele andere Proteine gezeigt werden.⁽¹²⁾ Die Konsensussequenz für die Di-Leucin-Motive ist (D/E)XXXL(L/I).⁽¹²⁾

2.2.3. Zelluläre Adaptorprotein(AP)-Komplexe

Signale für die basolaterale Sortierung von Transmembranproteinen sind Tyrosin-(YXXØ, NPXY) oder Leucin-abhängige ([D/E]XXXL[L/I]) Motive in den zytoplasmatischen Domänen von Transmembranproteinen. Diese Peptidsequenzen können von Adaptorprotein(AP)-Komplexen erkannt werden, welche dann über direkte Interaktion die Verpackung ihres „Cargos“ in entstehende Vesikel steuern. Somit vermitteln sie den Transport entlang verschiedener intrazellulärer Transportwege.^(12, 126) Bislang waren vier verschiedene Klassen dieser AP-Komplexe bekannt: AP-1A, AP-2, AP-3A und AP-4

(Abb. II.7.). Dabei handelt es sich um Heterotetramere, die aus zwei ca. 100 kDa großen Untereinheiten (γ , α , δ oder ϵ und $\beta 1$ - $\beta 4$), einer mittleren ca. 50 kDa großen Untereinheit ($\mu 1$ - $\mu 4$) und einer kleinen ca. 20 kDa großen Untereinheit ($\sigma 1$ - $\sigma 4$) bestehen.^(12, 72) Alle AP-Komplexe haben eine „Kopf“-Region (*trunk*) bestehend aus der mittleren und der kleinen Untereinheit, sowie den N-terminalen Anteilen der großen Untereinheiten und eine „Ohr“-Region (*ear*) die durch die C-terminalen Anteile der zwei großen Untereinheiten gebildet wird (Abb. II.8.). Die verschiedenen Untereinheiten übernehmen unterschiedliche Aufgaben. So ist die β -Untereinheit von AP-1, AP-2 und AP-3 für die Bindung an Clathrin zuständig. AP-4 hingegen scheint nicht in Verbindung mit Clathrin zu stehen.⁽¹²⁶⁾ Die μ -Untereinheiten vermitteln die Interaktion der AP-Komplexe an die spezifischen Signale NPXY, YXX \emptyset und Di-Leucine.^(11, 67) Aber auch die β -Untereinheit scheint in der Lage zu sein, an die Di-Leucin-Motive binden zu können.⁽¹²³⁾ Für AP-1A wurde beschrieben, dass es beim Transport vom TGN zu den Kompartimenten des endosomalen/lysosomalen Systems eine Rolle spielt. AP-2 hingegen vermittelt die Clathrin-abhängige Endozytose von der Plasmamembran. Den Transport vom TGN zum Lysosom über das Endosom vermittelt AP-3A. Neben den ubiquitär exprimierten AP-Komplexen gibt es die zelltyp-spezifischen Varianten AP-1B und AP-3B. AP-1B unterscheidet sich von AP-1A nur durch das Vorhandensein einer anderen μ -Untereinheit, nämlich $\mu 1B$. Die restlichen Untereinheiten sind identisch.⁽⁵¹⁾ Die Variante AP-1B kommt ausschließlich in polarisierten Epithelzellen vor, wohingegen AP-1A hier nicht exprimiert wird. AP-1B ist für den basolateralen Transport von Transmembranproteinen über das basolaterale oder gewöhnliche *recycling endosome* zuständig.^(50, 52) Die Variante AP-3B kommt nur in Neuronen vor und ist dort bei der Biogenese von synaptischen Vesikeln beteiligt.⁽¹⁴²⁾ Bei AP-4 handelt es sich um einen Proteinkomplex, der mit dem TGN assoziiert ist und genau wie AP-1B Proteine zur basolateralen Membran transportiert, jedoch nicht in Verbindung mit *clathrin coated vesicles* steht.^(33, 63, 137) Die konkrete Rolle von AP-4 beim zellulären Transport ist aber nach wie vor noch nicht ganz klar.

Neuste Untersuchungen geben Anlass zu der Vermutung, dass ein weiterer AP-Komplex, nämlich AP-5 existiert.⁽⁶⁴⁾ Dieser ähnelt von seiner Struktur her stark den

bereits bekannten Komplexen und spielt vermutlich ebenfalls beim Transport vom Endosom in andere Kompartimente eine Rolle. Ebenso wie AP-4 besteht keine Interaktion mit Clathrin.

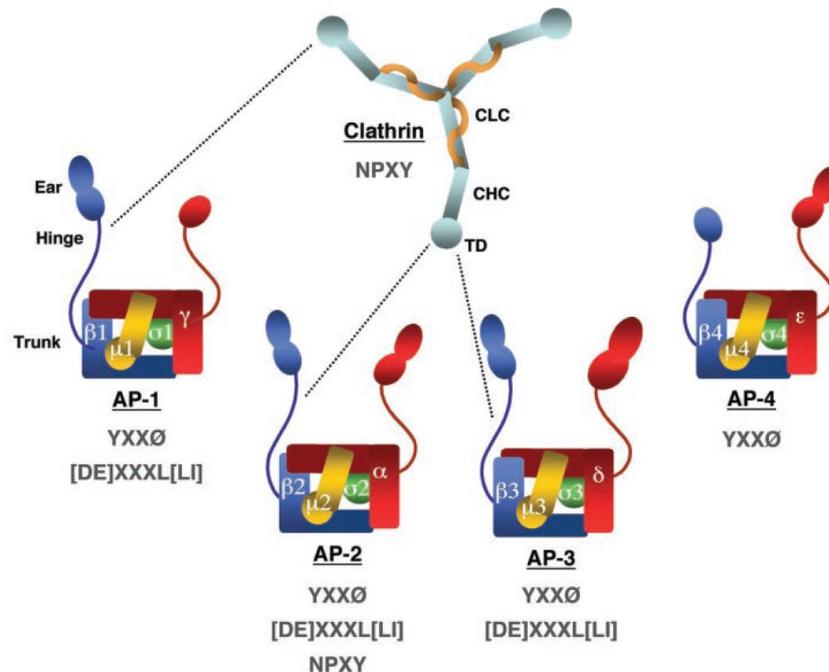


Abb. II.8.: Schematische Darstellung der Adaptorprotein(AP)-Komplexe und ihrer Interaktion mit Clathrin. Die bis jetzt bekannten AP-Komplexe bestehen jeweils aus zwei großen (γ , α , δ oder ϵ und $\beta 1$ - $\beta 4$), einer mittleren ($\mu 1$ - $\mu 4$) und einer kleinen ($\sigma 1$ - $\sigma 4$) Untereinheit. Eine Untereinheit von Clathrin ist hier ebenfalls dargestellt. Diese interagiert mit den AP-Komplexen über ihre terminale Domäne (TD) und besteht darüber hinaus aus jeweils drei schweren (CHC) und drei leichten (CLC) Ketten. AP-1, AP-2 und AP-3 interagieren mit Clathrin, AP-4 hingegen nicht. Die Sortierungssignale sind unter den AP-Komplexen in grauen Buchstaben aufgeführt. (modifiziert nach Bonifacino und Traub⁽¹²⁾)

2.3. Virusinfektion von polarisierten Epithelzellen

Epithelzellen bilden ein- oder mehrlagige Zellschichten aus, die die gesamte Körperoberfläche außen und innen auskleiden. So stellen sie für Mikroorganismen die erste Barriere zum Eintritt in den Körper dar und werden daher auch für viele Viren zu wichtigen Zielzellen. Ihre polarisierte Organisation wirkt sich häufig auf den Infektionsverlauf aus. So bestimmt z.B. die polarisierte Verteilung von Virusrezeptoren,

von welcher Seite Epithelzellen infiziert werden können. Das Hepatitis A Virus,⁽⁸⁾ sowie das Respiratorische Synzytialvirus (RSV)⁽¹⁶⁶⁾ können polarisierte Epithelzellen beispielsweise nur von der apikalen Seite infizieren, da sich die genutzten zellulären Rezeptoren ausschließlich auf dieser Seite befinden. Das Humane Cytomegalie-Virus (HCMV)⁽⁶⁹⁾ und das Vesikuläre Stomatitisvirus (VSV)⁽⁴⁷⁾ können hingegen bedingt durch die Rezeptorexpression nur von der basolateralen Zellseite infizieren. Neuste Untersuchungen haben für das Masernvirus gezeigt, dass es zum Wiedereintritt in die Epithelzellen des Respirationstraktes nach der systemischen Phase das lateral exprimierte *adherens junction*-Protein *nectin-4* als Rezeptor nutzt.⁽¹¹¹⁾

Neben dem Viruseintritt kann auch die Virusfreisetzung polarisiert erfolgen. Ausschlaggebend ist hier oft die polarisierte Verteilung der viralen Glykoproteine. So führt beispielsweise die apikale Expression des Hämagglutinins und der Neuraminidase zum apikalen *budding* von neu gebildeten Influenzaviren. Im Fall von VSV koordiniert die basolaterale Lokalisation des G-Proteins die ebenfalls basolaterale Freisetzung neuer Viren. Dass die Verteilung der Glykoproteine aber nicht zwingend den Ort der Knospung neuer Viren bestimmen muss, zeigen das Masernvirus (MV)⁽⁹⁰⁾ sowie das Marburgvirus (MARV)⁽¹⁴³⁾. Hier ist nicht die Verteilung der Glykoproteine ausschlaggebend, sondern vielmehr die Verteilung des viralen Matrixproteins.

Auch für den weiteren Verlauf einer Infektion spielt die polarisierte Freisetzung von Viren eine entscheidende Rolle. Werden die neuen Viren, wie z.B. Influenza,⁽¹¹³⁾ nur über die apikale Membrandomäne entlassen, kommt es in der Regel nur zu einer lokalen Infektion, da die Viren die Epithelbarriere nicht überwinden können. Basolaterales *budding* hingegen erlaubt dem Virus die Infektion des subepithelialen Gewebes und den Übergang ins Blutssystem, was letztendlich zu einer systemischen Infektion führt.

3. Fragestellung und Zielsetzung

Das NiV repliziert, nachdem es über Aerosole in den Körper aufgenommen wurde, vermutlich in den polarisierten Epithelzellen des Respirationstrakts, überwindet diese Barriere und verursacht eine systemische Infektion. Dabei kommt es zur Infektion von Endothelzellen kleiner Blutgefäße. Im ZNS ist diese Infektion am stärksten ausgeprägt und führt letztendlich zu einer Vaskulitis mit Nekrosen und Thrombosen. Spät in der Infektion gelangt das Virus erneut in Epithelzellen, zum einen in der Lunge und zum anderen über Epithelzellen der Niere. Dies ist letztendlich verantwortlich für eine NiV-Ausscheidung über Aerosole und Urin. Polarisierte Epithelzellen spielen also sowohl beim Eintritt, als auch bei der Übertragung der NiV Infektion eine wichtige Rolle.

In einer früheren Arbeit⁽¹⁵⁰⁾ konnte gezeigt werden, dass beide NiV-Glykoproteine in polarisierten MDCK-Zellen hauptsächlich basolateral exprimiert werden. Es ist bekannt, dass die basolaterale Expression fusogener Glykoproteine zur Fusion benachbarter Zellen führt, wodurch der polarisierte Zellverband zerstört wird und sich die Infektion *in vivo* in das subepitheliale Gewebe ausbreiten kann. Daher sollte zunächst die Verteilung der NiV-Glykoproteine in infizierten polarisierten MDCK-Zellen untersucht werden. Hierfür sollten auf Transwellfilter kultivierte polarisierte MDCK-Zellen im Hochsicherheitslabor infiziert werden und danach die Oberflächenverteilung der NiV-Glykoproteine durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse und konfokale Mikroskopie analysiert werden.

Kleine Peptidmotive in den zytoplasmatischen Domänen, die häufig mit Motiven für die Endozytose überlappen, sind in der Regel für die basolaterale Sortierung von Transmembranproteinen verantwortlich. Beide NiV-Glykoproteine besitzen solche potentielle Motive. Das NiV G-Protein hat an der Position 41/42 ein Di-Leucin- und an der Position 28/29 ein Di-Tyrosinmotiv. Das NiV F-Protein besitzt ebenfalls ein Di-Tyrosinmotiv (542/543), aber auch ein klassisches basolaterales Sortierungssignal Y₅₂₅SRL. Für letzteres wurde bereits gezeigt, dass es für die Endozytose und damit die Aktivierung des F-Proteins unerlässlich ist.^(35, 36, 117, 150, 151) In dieser Arbeit sollte nun der Einfluss dieser potentiellen Signale auf den basolateralen Transport und die

Fusionsaktivität in polarisierten Zellverbänden untersucht werden. Hierfür sollten wildtypische und mutierte F- und G-Proteine stabil in MDCK-Zellen exprimiert werden, auf Transwellfiltern polarisiert angezchtet und die Oberflächenverteilung und die Zell-Zell-Fusionsaktivität der Glykoproteine mittels konfokaler Immunfluoreszenzanalyse untersucht werden.

Zur näheren Charakterisierung des intrazellulären Transportes der NiV-Glykoproteine sollte im Weiteren die Interaktion mit zellulären AP-Komplexen (AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4) analysiert werden.

III. Material

1. Chemikalien und Verbrauchsmaterial

Aceton	Riedel-de Haen, Seelze
Agarose NA (<i>ultra pure</i>)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Ampicillin (Natrium-Salz)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Bacto-Agar	Becton Dickinson, Heidelberg
Borsäure	Fisher Scientific, Leicestershire, Großbritannien
Bromphenolblau (BPB)	Merck, Darmstadt
Bovines Serumalbumin (BSA) Fraktion 5	Serva, Heidelberg
Calciumchlorid (CaCl ₂)	Merck, Darmstadt
DABCO (1,4-Diazabicyclo[2,2,2]octan)	Merck, Darmstadt
DAPI (4,6-Diamidino-2-Phenylindol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Desoxycholsäure (DOC)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Didesoxynukleotide (dNTPs)	Fermentas, St. Leon-Rot
DMSO (Dimethylsulfoxid)	WAK-Chemie, Steinbach
EDTA (Ethylendiamintetraessigsäure)	Roth, Karlsruhe
Essigsäure	Riedel-de Haen, Seelze
Ethanol, abs. (EtOH)	Roth, Karlsruhe
Ethidiumbromid (EtBr)	Roche, Mannheim
Fötales Kälberserum (FCS)	PAN-Biotech, Aidenbach
Glycerin	Roth, Karlsruhe
Glycin	Roth, Karlsruhe
Hefeextrakt	Merck, Darmstadt
Isopropanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Kaliumchlorid (KCl)	Merck, Darmstadt
Kaliumdihydrogenphosphat (KH ₂ PO ₄)	Merck, Darmstadt

Kanamycin	Gibco BRL, Eggenstein
L-Glutamin	Gibco BRL, Eggenstein
Lipofectamine™ 2000 Transfektionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck, Darmstadt
Mass Ruler™ DNA Ladder, Mix	Fermentas, St. Leon-Rot
β-Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Methanol	Sigma-Aldrich, Steinheim
Mowiol 4-88	Calbiochem, San Diego, USA
MRA (<i>Mycoplasma Removal Agent</i>)	MP Biomedicals
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid (NaCl)	Roth, Karlsruhe
Natriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt
Natriumpyruvat	BD Biosciences
Paraformaldehyd (PFA)	Sigma-Aldrich, Steinheim
PEG (Polyethylenglykol)	Sigma-Aldrich, Steinheim
Penicillin/Streptomycin (P/S)	Gibco BRL, Eggenstein
Pepton aus Casein	Merck, Darmstadt
Polybrene (Hexadimethrine Bromide)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Prestained Protein Marker Broad Range	NEB, Frankfurt a.M.
Salzsäure (HCl)	Merck, Darmstadt
Sucrose	Serva, Heidelberg
Tris (Trishydroxymethylaminomethan)	Acros, Geel, Belgien
Triton X-100	Sigma-Aldrich, Steinheim
Zeocin™	InvivoGen, San Diego, USA

2. Enzyme

SAP (shrimp alkaline phosphatase)	Fermentas, St. Leon-Rot
T4 DNA Ligase	Fermentas, St. Leon-Rot
Trypsin/EDTA	Gibco BRL, Eggenstein

Velocity DNA-Polymerase	Bioline, Luckenwalde
KAPA HiFi DNA-Polymerase	Kapa Biosystems, Woburn, USA
Restriktionsendonukleasen:	
BamHI (5'-G [^] GATCC-3')	NEB, Frankfurt a.M.
XbaI (5'-T [^] CTAGA-3')	NEB, Frankfurt a.M.
PstI (5'-CTGCA [^] G-3')	NEB, Frankfurt a.M.
XhoI (5'-C [^] TCGAG-3')	NEB, Frankfurt a.M.

Die entsprechenden Puffer wurden von den jeweiligen Firmen bezogen.

3. Antikörper

Primärantikörper:

	<u>Spezies</u>	
anti-NiV-Serum gp3 (Serum eines infizierten Meerschweinchens)	Meerschweinchen	Dr. H. Weingartl und Dr. M. Czub, Winnipeg, Kanada
anti-Flag	Maus	Sigma Aldrich, Steinheim
anit-AP1S1, Adaptor-related Protein Complex 1, Sigma 1 Subunit, human	Maus	LifeSpan Biosciences, Seattle, USA
anit-AP-2 μ 1 (H-122): sc-99026	Kaninchen	Santa Cruz Biothecnology, Inc., Santa Cruz, USA
anti-AP-3 μ (H-55): sc-99186	Kaninchen	Santa Cruz Biothecnology, Inc., Santa Cruz, USA
anti-AP-4 σ (D-16): sc-18491	Ziege	Santa Cruz Biothecnology, Inc., Santa Cruz, USA
anti E-Cadherin	Maus	Sigam Aldrich, Steinheim
mAK anti-NiV F (mAb 92)	Kaninchen	Benhur Lee, Los Angeles, USA
mAK anti-NiV G (mAb26)	Kaninchen	Benhur Lee, Los Angeles, USA

Sekundärantikörper:

	<u>Spezies</u>	
anti-Maus IgG/ Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen, Oregon, USA
anti-Maus IgG/ Alexa Fluor 568	Ziege	Invitrogen, Oregon, USA
anti-Meerschweinchen IgG/ Alexa Fluor 488	Ziege	Invitrogen, Oregon, USA
anti-Meerschweinchen IgG/ Alexa Fluor 568	Ziege	Invitrogen, Oregon, USA
anti-Meerschweinchen IgG/ DyLight 405	Esel	Thermo Fischer Scientific, Waltham, USA
anti-Meerschweinchen IgG/ FITC	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Meerschweinchen IgG/ Rhodamin	Ziege	Dianova, Hamburg
anti-Meerschweinchen IgG/ Peroxidase	Kaninchen	DAKO, Glostrup, Dänemark

4. Kits

peqGOLD Plasmid MiniPrep Kit II	Peqlab, Erlangen
QIAGEN HiSpeed Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAGEN Plasmid <i>Plus</i> Maxi Kit	Qiagen, Hilden
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen, Hilden

Die Komponenten der Kits und die Zusammensetzung der jeweils enthaltenen Lösungen können den entsprechenden Firmenprotokollen entnommen werden.

5. Plasmide

pCAGGS leer	Boris Lamp, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS NiV G codonopt.	Boris Lamp, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCAGGS NiV F _{wt}	Eva Haller, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pczCFG5 NiV F _{wt}	Dr. M. Czub, Winnipeg, Kanada
pczCFG5 NiV F _{Y542/543A}	Carola Vogt, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pczCFG5 NiV F _{Y525A}	Carola Vogt, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pczCFG5 NiV F _{YA}	Carola Vogt, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pczCFG5 NiV G _{wt}	Carola Vogt, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pczCFG5 NiV G _{wt}	Carola Vogt, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pczCFG5 NiV G _{Y28/29A}	Carola Vogt, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pczCFG5 NiV G _{Y28A}	Carolin Weise, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pczCFG5 NiV G _{Y29A}	Carolin Weise, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pczCFG5 NiV G _{L41/42A}	Carola Vogt, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pIG I	Prof. Dr. W. Garten
pCG μ AP-1A mouse c-tag	Carolin Weise, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCG μ AP-1B human c-tag	Carolin Weise, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCG μ AP-2 mouse c-tag	Carolin Weise, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCG μ AP-3A rat c-tag	Carolin Weise, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pCG μ AP-4 human c-tag	Carolin Weise, AG Maisner, Institut für Virologie, Marburg
pczCFG5-VSV G	Dr. Jürgen Schneider-Schaulies, Würzburg
pHit60	Dr. Jürgen Schneider-Schaulies, Würzburg

6. Primer

Die in dieser Arbeit verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma MWG (Ebersberg) synthetisiert.

Die Sequenzen der Primer sind in 5'-3'-Richtung angegeben.

Bezeichnung	Sequenz
pCG seq MCS for	CAT GTT CAT GCC TTC TTC
pCG seq MCS rev	CAT TGC AAT AGT GTG TTG G
AP-1A BamHI for	CGG GAT CCC GGC CGC CAT GTC CGC CAG
AP-1A XbaI rev	GCT CCG GAC CCA GGA TTA CAA GGA TGA CGA CGA TAA GTG ACT CTA GAG C
AP-1B XbaI for	GCT CTA GAG CGC CAC CAT GTC CGC C
AP-1B XbaI rev	CTT CGT ACC AGC GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG TAG CTC TAG AGC
AP-2 XbaI for	GCT CTA GAG CGC CAC CAT GAT CGG AGG CTT ATT C
AP-2 XbaI rev	GAA ACC CGC TGC GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG TAG CTC TAG AGC
AP-3A BamHI for	CGG GAT CCC GGG GAA AAT GAT CCA CAG TCT ATT TCT CAT CAA C
AP-3A PstI rev	CCA AGT GAG GAC AGA TTA CAA GGA TGA CGA CGA TAA GTG ACT GCA GCG
AP-4 XbaI for	GCT CTA GAG CGC GGC CAT GAT TTC CCA ATT CTT CAT TCT G
AP-4 XbaI rev	GTC ATT CGG ATC GAT TAC AAG GAT GAC GAC GAT AAG TGA CTC TAG AGC

7. Zellkulturmedien

Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM)	Invitrogen, Karlsruhe
FCS (fötales Kälberserum)	Invitrogen, Karlsruhe
Geneticin	
Kulturgefäße	Greiner Bio-One, Frickenhausen
L-Glutamin	Invitrogen, Karlsruhe
Minimal Essential Medium (MEM)	Invitrogen, Karlsruhe
OptiMEM	Invitrogen, Karlsruhe
Penicillin/Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe
PET Transwell Filter, 0,4 µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
PET Transwell Filter, 1,0 µm	Greiner Bio-One, Frickenhausen
Zeocin	InvivoGen, San Diego, USA

8. Zelllinien

MDCK II (<i>Madin-Darby canine kidney</i>)		Nierenepithelzelllinie eines Cockerspaniels (<i>Canis familiaris</i>)
Vero		Nierenepithelzelllinie einer afrikanischen Grünen Meerkatze (<i>Ceropithecus aethiops</i>)
MDCK II Okt 04 F _{wt}	Carola Vogt, AG Maisner	siehe MDCK II, exprimiert NiV Fwt stabil
MDCK II Nov 04 F _{Y542/543A} 2	Carola Vogt, AG Maisner	siehe MDCK II, exprimiert NiV F _{Y542/543A} stabil
MDCK II F _{Y525A} 2	Carola Vogt, AG Maisner	siehe MDCK II, exprimiert NiV F _{Y525A} stabil
MDCK II Nov 04 F _{YA}	Carola Vogt, AG Maisner	siehe MDCK II, exprimiert NiV F _{YA} stabil

MDCK II Sept 05 G _{w^t} 5	Carolin Weise, AG Maisner	siehe MDCK II, exprimiert NiV G stabil
MDCK II Sept 05 G _{Y28/29A} 6	Carolin Weise, AG Maisner	siehe MDCK II, exprimiert NiV G _{Y28/29A} stabil
MDCK II Jan 10 G _{Y28A} 1	Carolin Weise, AG Maisner	siehe MDCK II, exprimiert NiV G _{Y28A} stabil
MDCK II Jan 10 G _{Y29A} 2	Carolin Weise, AG Maisner	siehe MDCK II, exprimiert NiV G _{Y29A} stabil
MDCK II Sept 05 G _{Y41/42A} 5	Carolin Weise, AG Maisner	siehe MDCK II, exprimiert NiV G _{Y41/42A} stabil

9. Medien für Bakterien

LB-Medium

10 g	Pepton
5 g	Hefeextrakt
10 g	NaCl
	ad 1 l dH ₂ O
	autoklavieren

LB-Agar (1,5 %)

3,75 g	Bacto-Agar
	ad 250 ml LB-Medium

10. Bakterien

Escherichia coli, Stamm XL1-Blue

Stratagene, Heidelberg

11. Viren

Nipahvirus (NiV)-Isolat aus humanem Hirngewebe

Dr. J. Cardoso, Malaysia

12. Puffer

BPB-Probenpuffer (6x) für Agarosegele

0,25 %	Bromphenolblau (BPB)
40 %	Sucrose
	in dH ₂ O aufnehmen

PBS def. (*phosphate buffered saline deficient*)

8 g	NaCl
0,2 g	KCl
0,2 g	KH ₂ PO ₄
1,15 g	Na ₂ HPO ₄
	ad 1 l H ₂ O

PBS++

0,1 g	MgCl ₂
0,13 g	CaCl ₂
	ad 1 l PBS def

TBE-Puffer (10x)

121,2 g	Tris
51,4 g	Borsäure
3,7 g	EDTA
	ad 1 l H ₂ O

Tfb-Puffer 1

30 nM	Calciumacetat
50 nM	MnCl ₂
100 nM	KCl
10 nM	CaCl ₂
15 %	Glycerin
	steril filtern

Tfb-Puffer 2

10 nM	Na-MOPS (pH 7)
10 nM	KCl
75 nM	CaCl ₂
15 %	Glycerin
	steril filtern

13. Mowiol

Mowiol wird zum Eindeckeln der Präparate der Immunfluoreszenz benutzt.

2,4 g	Mowiol 4-88
6 g	Glycerin
6 ml	H ₂ O

über Nacht quellen lassen

2 ml	0,2 M Tris (pH 8,5)
------	---------------------

Der Ansatz löst sich bei 50-60 °C unter ständigem Rühren. Anschließend wird er für 15 min bei 4000 rpm zentrifugiert, der Überstand abgenommen und mit DABCO (10 % w/v) versetzt. Das Mowiol wird aliquotiert und bei -20 °C gelagert.

IV. Methoden

1. Molekularbiologische Methoden

1.1. Polymerase-Kettenreaktion

Bei der Polymerasen-Kettenreaktion wird ein durch einen *forward* und einen *reversen* Primer eingegrenzter DNA-Abschnitt selektiv amplifiziert. Primer sind Oligonukleotide, die an die einzelsträngige DNA binden und der Polymerase als Startpunkt für die Synthese dienen. Neben der Ausgangs-DNA (*template*) und den Primern enthält ein PCR-Ansatz Desoxynukleotide (dNTPs) und eine hitzestabile DNA-Polymerase.

Die Reaktion läuft in mehreren Zyklen ab, die jeweils aus drei Phasen bestehen. In der ersten Phase, der Denaturierungsphase, wird die DNA bei hohen Temperaturen aufgeschmolzen. In der zweiten Phase, dem *Annealing*, hybridisieren die Primer bei deutlich niedrigerer Temperatur mit dem DNA-*template*. Die Hybridisierungstemperatur wird hierbei individuell auf die Schmelztemperatur der Primer abgestimmt. In der dritten Phase, der *Elongation*, wird ausgehend von den gebundenen Primern die DNA zum Doppelstrang ergänzt.

In dieser Arbeit wurde hauptsächlich die *Velocity* DNA-Polymerase verwendet. Diese Polymerase besitzt einen Korrekturlesemechanismus, d.h. nicht oder falsch eingebaute Nukleotide werden durch eine 3'→5'-Exonucleaseaktivität herausgeschnitten und anschließend korrekt ersetzt. Die Zusammensetzung der Reaktionsansätze und Zyklen der Polymerase-Kettenreaktion entsprachen den Angaben des Herstellers.

Durch Anpassen der Nukleotidsequenz der Primer konnten dem zu amplifizierenden DNA-Stück neue Nukleotide angehängt oder ausgetauscht werden. Dies wurde beispielsweise verwendet, um neue Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen einzufügen.

1.2 Gezielte Mutagenese (Austausch einzelner Aminosäuren)

Die sogenannte *QuickChange*-Methode ermöglicht den Austausch oder die Deletion von einer oder mehreren Aminosäuren in einem Protein durch Einführen von Punktmutationen oder Deletionen in das für das Protein kodierende Gen (Abb. IV.1.). Zwei Primer (*forward* und *reverse*), die die gewünschte Mutation tragen und zur Plasmid-DNA komplementär sind, wurden in einer Polymerase-Kettenreaktion mit Hilfe der KAPA HiFi-Polymerase (KAPA Biosystems), die dank ihrer 3'→5'-Exonukleaseaktivität eine hohe Genauigkeit bei der Synthese aufweist, über das ganze Plasmid verlängert. Dabei entstanden doppelsträngige Plasmide, die die gewünschte Mutation auf einem Strang trugen, deren Einzelstränge aber nicht kovalent geschlossen waren, sondern jeweils am 5'-Ende einen Bruch aufwiesen. Die parenterale Plasmid-DNA wurde durch Zugabe des Enzyms *DpnI*, welches spezifisch methylierte und halbmethylierte DNA schneidet, verdaut. Das in die Reaktion eingesetzte maternale Plasmid ohne Mutation wurde somit zerstört und übrig blieben die Plasmide, die die Mutation trugen. Nach Transformation (Kap. IV 1.7.) in Tfb-kompetente Bakterien wurden die Einzelstrangbrüche geschlossen. Die Selektion der Bakterien geschah über eine plasmidkodierte Antibiotikaresistenz. Nach dieser Methode wurden in dieser Arbeit die mutierten G-Proteine G_{Y28A} und G_{Y29A} hergestellt.

1.3. Elektrophoretische Auftrennung von DNA im Agarosegel

Im elektrischen Feld wandern DNA-Fragmente auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatgruppen zur Anode. Ihre Laufgeschwindigkeit im Agarosegel nimmt dabei mit zunehmender Länge der Fragmente ab. Die Trennleistung durch Agarosegele bewegt sich zwischen wenigen hundert bis zu mehreren tausend Basenpaaren. Durch Variation der Agarosekonzentration zwischen 0,5 % und 2 % kann die Trennleistung des Agarosegels bestimmt werden. Im Agarosegel ist Ethidiumbromid enthalten, das in doppelsträngige DNA interkaliert und unter UV-Licht fluoresziert. So werden DNA-Banden im Gel sichtbar gemacht. Die Fragmentlängen und die DNA-Menge kann man über im Gel mitgeführte Längen- und Mengenstandards (Marker) abschätzen.

Die Agarose wurde in 0,5fachem-TBE-Puffer in der MikroWelle aufgeköcht bis sie vollständig gelöst war. Nach Abkühlen auf etwa 50 °C wurde Ethidiumbromid-Lösung (10 mg/ml) bis zu einer Endkonzentration von 0,5 µg/ml zugegeben und die geschmolzene Agarose in einen mit einem Kamm bestückten Gelschlitten gegossen. Nach dem Erstarren des Gels wurde es mit dem Schlitten in die Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 0,5fachem TBE-Puffer überschichtet. Alle Proben wurden vor dem Auftragen mit 6fachem Probenpuffer versetzt und dann in die Taschen, die nach Entfernen des Kammes entstehen, pipettiert, wobei die im Probenpuffer enthaltene Saccharose das Absinken der Proben gewährleistete. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 100 V (bei analytischen Gelen) bis 150 V (bei präparativen Gelen) für unterschiedliche Zeiten (20 min bis 1,5 h) durchgeführt. Anschließend konnten die DNA-Banden im Gel unter UV-Licht (254 nm) sichtbar gemacht und ausgeschnitten oder fotografiert werden.

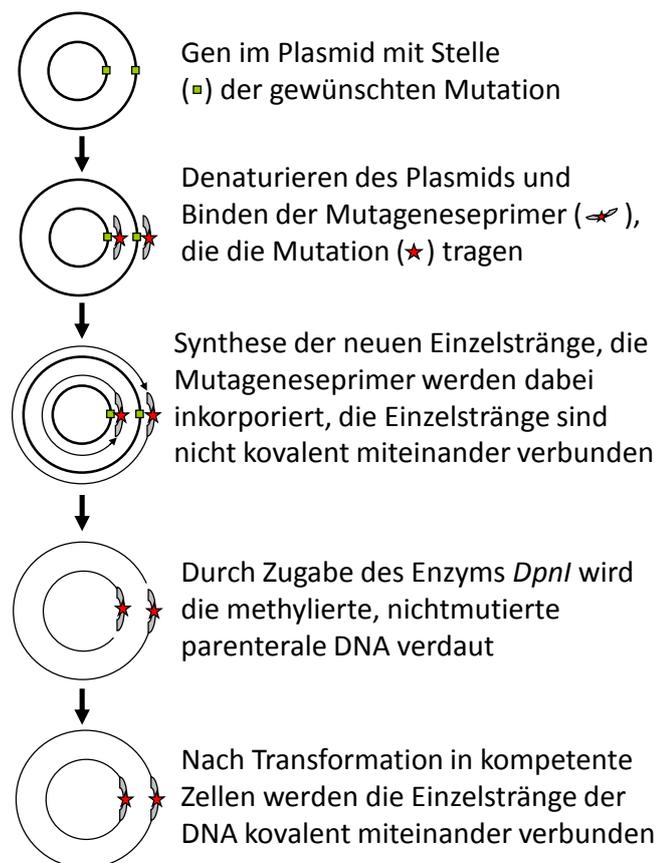


Abb. IV.1: : Schematische Darstellung der gerichteten Mutagenese.

1.4. Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die DNA an oder in der Nähe von spezifischen Sequenzen schneiden. Diese Erkennungssequenzen sind oft Palindrome, also kurze Abschnitte innerhalb derer beide Stränge, jeweils von 5' nach 3' gelesen, die gleiche Sequenz haben. Durch Behandlung mit Restriktionsendonukleasen lässt sich doppelsträngige DNA in Fragmente definierter Länge mit ebenfalls definierten, überhängenden Enden (*sticky ends*) oder nicht überhängenden Enden (*blunt ends*) zerschneiden.

Für analytische Restriktionsverdau wurden 0,5 µg bis 1 µg DNA in einem Reaktionsvolumen von 10 µl eingesetzt, für präparative Zwecke 5 µg, in entsprechend größeren Reaktionsansätzen. Es wurden 5 Units eines Restriktionsenzym pro µg DNA verwendet. Die Reaktionspuffer und Inkubationstemperaturen wurden entsprechend der Herstellerangaben für das jeweilige Restriktionsenzym ausgewählt, die Inkubationszeit betrug meist zwischen 2 h und 3 h, für einen präparativen Verdau bis zu 16 h. Anschließend wurde die DNA mit 6x Probenpuffer versetzt, in einem 1 %igen Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt und durch den interkalierenden Farbstoff Ethidiumbromid sichtbar gemacht. Für präparative Zwecke wurden die entsprechenden Banden unter langwelligem UV-Licht (254 nm) ausgeschnitten und die DNA mit dem *QIAquick Gel Extraction Kit* der Fa. Qiagen nach Herstellerangaben isoliert.

1.5. Vektorverdau und Dephosphorylierung

Nach Verdau des Plasmid-Vektors mit den jeweiligen Enzymen wurde dieser mit alkalischer Phosphatase (SAP= *Shrimp Alkalischer Phosphatase*) behandelt. Diese entfernt die 5' gelegenen Phosphatgruppen am linearisierten Plasmid und verhindert somit eine Rezirkularisierung des Vektors. Hierfür wurde die linearisierte Plasmid-DNA 1 h bei 37 °C mit 5 U SAP in SAP-Puffer inkubiert. Anschließend wurde das Enzym bei 65 °C inaktiviert.

1.6. Ligation

Um linearisierte Vektor- und Insert-DNA miteinander zu verbinden, verwendet man DNA-Ligasen. Diese verknüpfen unter ATP-Verbrauch die freien 3'-OH-Gruppen und 5'-Phosphatreste durch eine Phosphodiesterbindung kovalent miteinander. Nachdem durch Abschätzen der Bandenintensitäten die Konzentrationen der Vektor- und Insert-DNA in einem Agarosegel bestimmt wurden, wurden diese in einem molaren Verhältnis von 1:3 vermischt und über Nacht bei Raumtemperatur zusammen mit 10 U der T4 DNA-Ligase inkubiert. Die Ligationsansätze wurden abschließend mittels Hitzeschocktransformation (vgl. Kap. IV. 1.7.) in kompetente *Escherichia coli* (*E. coli*) eingebracht.

1.7. Hitzeschock-Transformation

Bestimmte Bakterien, wie z.B. *E.coli*, sind in der Lage durch, Behandlung mit Chemikalien fremde Plasmid-DNA aufzunehmen.⁽²⁸⁾ Eine Steigerung der Effizienz dieser DNA-Aufnahme lässt sich durch Hitzeeinwirkung, den sogenannten Hitzeschock, erreichen. Über eine Plasmid-kodierte Antibiotikaresistenz erfolgt die Selektion der erfolgreich transformierten Bakterien.

Bei der Tfb (*transformation buffer*)-Transformation wurden 100 ml LB-Medium mit 1 ml einer *E.coli*-Übernachtskultur des Stammes XL1-Blue angeimpft und bis zu einer OD₆₀₀ bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien bei 3000 rpm für 10 min und bei 4 °C zentrifugiert, das Medium verworfen und das Bakterienpellet nach Resuspendieren in 40 ml Tfb-Puffer 1 für 20 min auf Eis inkubiert. Nach erneuter Zentrifugation für 8 min bei 3000 rpm und 4 °C wurde das Bakterienpellet in 4 ml Tfb-Puffer 2 aufgenommen und anschließend in 100 µl Aliquots bis zur Verwendung bei -80 °C gelagert.

Für die Transformation wurden die *E.coli*-Bakterien auf Eis aufgetaut, mit 1 µg Plasmid DNA vermischt und 20 min auf Eis inkubiert. Es folgte der Hitzeschock bei 42 °C für 90 sec und eine erneute Inkubation auf Eis für 2 min. Kodierte das Plasmid für eine Ampicillin-Resistenz, wurden die Bakterien sofort nach der Transformation auf eine

LB-Platte mit Ampicillin ausgestrichen. Lag jedoch eine Kanamycinresistenz vor, mussten die Bakterien zuvor für 60 min in 500 µl LB-Medium ohne Antibiotikum schüttelnd bei 37 °C inkubiert werden. Da Kanamycin durch Binden an die kleine Untereinheit der Ribosomen die Proteinbiosynthese direkt unterbindet, ist es nötig die Bakterien zuerst für eine bestimmte Zeit in Medium ohne Kanamycin zu kultivieren, damit die Proteinbiosynthese durchgeführt werden kann, um die Resistenz gegen Kanamycin auszubilden. Danach wurden die Bakterien auf LB-Platten mit Kanamycin ausgestrichen und über Nacht bei 37 °C inkubiert.

Resistente Kolonien wurde zur Gewinnung von DNA mittels DNA-Präparation in 2 ml Medium mit Antibiotikum für eine Mini- oder in 150 ml Medium mit Antibiotikum für eine Maxi-DNA-Präparation überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert.

1.8. DNA-Präparation

Zur Isolierung von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde das QIAGEN Plasmid Maxi Kit, das QIAGEN HiSpeed Plasmid Maxi Kit, das QIAGEN Plasmid *Plus* Maxi Kit oder Peqlab E.Z.N.A. Plasmid Miniprep Kit verwendet. Diese Präparations-Kits nutzen alle das Prinzip der alkalischen Lyse (7). Nach Zellyse und Neutralisation des Lysats wurden die Proteine und die chromosomale DNA gefällt und durch Zentrifugieren bei der Miniprep-Methode oder durch Filtration bei der Maxiprep-Methode von der gelösten Plasmid-DNA getrennt. Bei der Mini-Präparation wird die Plasmid-DNA unter Hochsalzbedingungen an eine Silikamembran gebunden. Durch Waschen mit dH₂O kann die gebundene DNA eluiert werden. Im Gegensatz dazu bindet die DNA bei der Maxi-Präparation unter Niedrigsalzbedingungen an eine Anionenaustauschsäule, von der sie nach einem Waschschrift mit einem Hochsalzpuffer eluiert, mit Isopropanol aus dem Eluat präzipitiert, mit 70 %igem Ethanol gewaschen und in dH₂O aufgenommen wird. Die Präparationen wurden nach den Angaben der Kit-Hersteller durchgeführt.

1.9. Quantifizierung von Nukleinsäure

In Wasser gelöste DNA absorbiert ultraviolettes Licht bei einem Absorptionsmaximum von 260 nm. Nach dem Lambert-Beerschen Gesetz besteht zwischen der Absorption und der Konzentration des absorbierten Stoffes in einem gewissen Bereich ein linearer Zusammenhang, so dass man die Konzentration der DNA durch Messung der Extinktion bei 260 nm bestimmen kann. Da eine optische Dichte $OD_{260} = 1$ einer DNA-Konzentration von 50 $\mu\text{g}/\text{ml}$ entspricht, gilt bei Verwendung einer Küvette mit einer Schichtdicke von 10 mm:

$$C_{DNA} = OD_{260} \cdot 50 \mu\text{g}/\text{ml} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

2. Zellbiologische Methoden

2.1. Zellkultur

In dieser Arbeit wurde ausschließlich mit permanenten Zelllinien gearbeitet. Hauptsächlich wurden MDCK-Zellen, polar wachsende Epithelzellen aus der Niere eines Cockerspaniels, verwendet. Verschiedene Versuche wurden darüber hinaus in Vero-Zellen, Nierenepithelzellen aus der afrikanischen Grünen Meerkatze, und 293T-Zellen, humanen Nierenepithelzellen, durchgeführt.

Alle Zellen wurden zweimal pro Woche passagiert und wuchsen adhärent bei 37 °C und 5 % CO_2 . Vero- und 293T-Zellen wurden in *Dulbecco's Minimalmedium* (DMEM) mit 10 % fötalem Kälberserum (FCS), der Aminosäure L-Glutamin, 100 U/ml Penicillin und 100 $\mu\text{g}/\text{ml}$ Streptomycin kultiviert, während MDCK-Zellen in *Minimal Essential Medium* (MEM) unter Zugabe von 10 % FCS, der Aminosäure L-Glutamin und Antibiotikum kultiviert wurden. Für MDCK-Zellen, die bestimmte Plasmide stabil exprimierten, wurde dem Medium ein Selektionsantibiotikum hinzugefügt (Genetizin und/oder Zeozin, siehe Kap. IV. 2.4.).

Zur Passage wurden die Zellen nach Abnahme des Zellkulturmediums mit PBS def gründlich gewaschen. Anschließend wurde 3 ml Trypsin/EDTA auf die Zellen gegeben, die Zellen damit unter Schwenken benetzt und nach kurzer Inkubation 2 ml wieder

entnommen und verworfen. Damit die Zellen sich vom Untergrund ablösen, wurden sie abhängig vom Zelltyp 1 min (293T-Zellen) bis 25 min (MDCK-Zellen) mit dem Rest Trypsin/EDTA im Brutschrank inkubiert. Durch Zugabe von Zellkulturmedium mit 10 % FCS wurde das Trypsin inaktiviert. Je nach Wachstumsverhalten wurden die Zellen 1:10 bis 1:30 umgesetzt, was bedeutet, dass 1/10 bis 1/30 der Zellsuspension in eine neue Zellkulturflasche gleicher Größe mit 20 ml frischem Zellkulturmedium überführt wurde. Die Zellen wurden dann wieder bei 37 °C und 5 % CO₂ bis zur vollständigen Konfluenz kultiviert.

Zum Einfrieren wurde die Zellen einer 75 cm²-Zellkulturflasche wie oben beschrieben mit Trypsin/EDTA abgelöst, in Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 2000 rpm und Raumtemperatur (RT) zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 2 ml „Einfriermedium“, bestehend aus normalem Zellkulturmedium mit 10 % FCS und zusätzlich 10 % sterilem Glycerin, aufgenommen. Je 1 ml (1/2 Zellkulturflasche) wurde in entsprechende Einfrierröhrchen überführt. Die Zellen wurden in speziellen Einfrierboxen, die mit Isopropanol gefüllt waren, über Nacht langsam und schonend heruntergekühlt, um dann am nächsten Tag in den Stickstofftank für die langfristige Lagerung überführt zu werden.

Um eingefrorene Zellen wieder in Kultur zu bringen, wurden die Zellen bei 37 °C im Wasserbad aufgetaut und in zwei 25 cm²-Zellkulturflaschen überführt. Nach mehreren Stunden (8 bis 16 h) Inkubation wurde das Medium gegen frisches Zellkulturmedium ausgetauscht, um sowohl tote Zellen als auch das Glycerin zu entfernen.

2.2. Kultivieren von MDCK-Zellen auf permeablen Filtermembranen

MDCK-Zellen bilden bei Wachstum auf porösen Filtermembranen (Transwell-Filter, siehe Abb. IV.1) einen polarisierten Phänotyp aus. In diesem Filtersystem sind die Zellen von der apikalen und basalen Seite her zugänglich, was eine selektive Markierung von Proteinen auf der apikalen oder basolateralen Membrandomäne durch z.B. Biotin oder Antikörper zulässt und somit die polarisierte Expression von

Proteinen untersucht werden kann. In dieser Arbeit wurden Filter von der Firma Greiner mit einer Porengröße von 0,4 μm oder 1,0 μm und einer Fläche von 4,5 cm^2 verwendet. Auf eine Filtermembran wurde 1/40 einer konfluent bewachsenen 75 cm^2 -Kulturflasche ausgesät. Die Zellsuspension wurde in die apikale Kammer des Filtereinsatzes, die zuvor mit 1,5 ml Kulturmedium gefüllt wurde, gegeben. In die basale Kammer wurden 3 ml Kulturmedium gegeben. Die MDCK-Zellen wurden bis zur Ausprägung einer vollständigen Polarität 5-7 Tag auf den Filtern kultiviert, wobei das Medium jeden Tag in beiden Kammern durch frisches ersetzt wurde (apikal: 2 ml, basal: 3 ml).

Die Polarität der Zellen lässt sich über eine Widerstandsmessung abschätzen, denn ein polarisierter Epithelverband setzt Strom durch die ausgebildeten *tight junctions* einen höheren Widerstand entgegen als unpolarisierte Zellen. Der transepitheliale Widerstand wurde mit Hilfe eines Messgeräts (Millicell ERS, Firma Millipore) verfolgt, und erreichte Werte von bis zu 150 Ω . Als polarisiert angesehen wurden MDCK-Zellen, wenn abzüglich des Leerwiderstandes mehr als 50 Ω gemessen werden konnten.

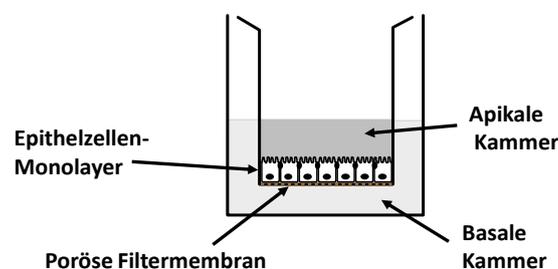


Abb. IV.2: Schematische Darstellung des Transwell-Filter-Systems zur Kultivierung von polarisierten Epithelzellen

2.3. Transfektion durch Lipofektion

Um Fremdgene in eukaryotische Zellen transient oder stabil zur Expression zu bringen wird gereinigte Plasmid-DNA mittels Lipofektion in die Zellen eingebracht. Dabei komplexieren polykationische Lipide mit der Plasmid-DNA und erlauben die

Überwindung der Zellmembran in das Zytoplasma bzw. den Zellkern. Die Fremdgene werden dann im Zellkern unter der Kontrolle eines konstitutiven Promotors wie zelluläre Gene transkribiert.

2.3.1. Transfektion von nicht polaren Zellen in Kulturschalen oder auf Deckgläschen durch Lipofektion

In dieser Arbeit wurde das Transfektionsreagenz Lipofektamin 2000 (LFA) gemäß den Herstellerangaben verwendet.

Die Zellen wurden am Vortag so ausgesät, dass sie zu 50-60 % konfluent waren. Für die Transfektion eines Deckgläschens im 24-Well-Format wurde 1-1,5 µl LFA mit 50 µl OptiMEM gemischt und 5 min bei RT inkubiert. In dieser Zeit wurde 1 µg DNA mit 50 µl OptiMEM gemischt und zum LFA-Ansatz gegeben. Während einer 20minütigen Inkubationszeit des DNA-LFA-Gemisches wurde das Kulturmedium der Zellen gegen Transfektionsmedium (ohne Antibiotikum) ausgetauscht. Danach wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen getropft. Nach einer Inkubationszeit von 5-6 h bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Transfektionsmedium entnommen und frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben.

Für die Transfektion im 6-Well-Format wurden 7,5-10 µl LFA und 5 µl DNA aufgenommen in jeweils 250 µl OptiMEM wie oben beschrieben verwendet.

2.3.2. Transfektion von polarisierten MDCK-Zellen durch Lipofektion

Um polarisierte MDCK-Zellen zu transfizieren, müssen die *tight* und *adherens junctions*, die die basolaterale und die apikale Domäne der Zellen trennen und die Zellen zu einem fest geschlossenen Verband machen, aufgelöst werden, damit die DNA nicht nur der wesentlich kleineren Oberfläche der apikalen Seite, sondern auch der basolateralen Seite zugänglich ist. Hierfür wurde 0,05 % Trypsin/0,53 mM EDTA verwendet, wobei das EDTA die Kalziumionen, die für die Aufrechterhaltung der *junctions* benötigt wird, bindet. Hierfür wurden die auf dem Filter polarisiert gewachsenen MDCK-Zellen mit PBS def. gewaschen, um das Kulturmedium vollständig

zu entfernen. Danach wurde sowohl in die apikale, als auch in die basale Kammer 1 ml 0,05 % Trypsin/0.53 mM EDTA gegeben und für 10 min bei RT inkubiert. Zum Stoppen der Reaktion wurde in die basale und apikale Kammer frisches Kulturmedium gegeben. Das FCS des Mediums inaktiviert hierbei das Trypsin-EDTA und verhindert somit ein weiteres Verdauen der Zellen. Zum Überprüfen der erfolgreichen Öffnung der *junctions*, wurde der transepitheliale Widerstand nach erneutem Wechsel gegen Transfektionsmedium gemessen. In der Regel war ein Absinken des Widerstandes um ca. 50-80 Ω messbar.

Vor der Behandlung der Zellen mit 0.05 % Trypsin/0.53 mM EDTA wurde das Transfektionsgemisch wie in Abschnitt IV. 2.4 beschrieben vorbereitet. Es wurden für einen Filter mit einer Fläche von 4,25 cm² 15 μ l LFA und 10 μ l DNA verwendet. Nach 5-6 Stunden wurde das Medium gegen frisches Kulturmedium mit Antibiotikum getauscht und erneut der transepitheliale Widerstand gemessen.

2.4. Herstellung stabil-expimierender MDCK-Zellen

2.4.1. Stabile Proteinexpression in MDCK-Zellen durch Lipofektion

Damit Fremdgene dauerhaft in Zellkultur exprimiert werden, muss es nach der transienten Transfektion zur Integration von Plasmid-DNA ins Zellgenom kommen. Enthält das Fremdgen tragende Expressionsplasmid ein Antibiotika-Resistenzgen oder wird ein weiteres Resistenzgen-tragendes Plasmid kotransfiziert, können Zellen, bei denen eine Integration der Plasmid-DNA stattgefunden hat, durch Antibiotikagabe selektioniert werden. Bereits zur Verfügung standen MDCK-Zellen mit folgenden NiV F-Proteinen: F_{wt.}, F_{Y525A}, F_{Y542/543A}, F_{YA} (C. Vogt⁽¹⁵⁰⁾).

Für diese Arbeit wurden weitere MDCK-Zelllinien hergestellt, die entweder das wildtypische oder eines der mutierten NiV G (G_{wt} bzw. G_{Y28/29}, G_{Y28A}, G_{Y29A}, G_{L42/43A}) stabil exprimieren. Hierfür wurden in 3,5 cm-Schälchen 50-60 % konfluente MDCK-Zellen mit den für die G-Proteine kodierenden Plasmiden (pczCFG5-NiV-G bzw. pczCFG5-NiV-G_{Y28/29}, pczCFG5-NiV-G_{Y28A}, pczCFG5-NiV-G_{Y29A}, pczCFG5-NiV-G_{L42/43A}) transfiziert. Diese Plasmide enthalten zusätzlich zu den Genen für die NiV G-Proteine

ein durch eine IRES getrenntes Fusionsprotein aus GFP und einem Zeozin-Resistenzprotein. Zusätzlich wurden die Zellen mit einem zweiten Plasmid (pIG), welches ein Genetizin(Neomycin)-Resistenzgen enthält, kotransfiziert. Durch Selektion mit Zeozin und Genetizin können nur Zellen, die beide Plasmide stabil eingebaut haben, überleben. Somit beschleunigt man die Selektion positiver Klone um ein Vielfaches. Für die Transfektion wurden jeweils 7,5 µl LFA bzw. 4,5 µg pczCFG5-DNA und 0,5 µg pIG-DNA (Verhältnis 1:10) in 250 µl OptiMEM aufgenommen. Die Transfektion wurde wie in IV. 2.3.1 beschrieben durchgeführt. Nach einem Tag wurde die Transfektionseffizienz mittels Analyse der GFP-Fluoreszenz der lebenden Zellen am Fluoreszenzmikroskop untersucht. War die Transfektionseffizienz gut, wurden die Zellen auf eine Schale mit 10 cm Durchmesser umgesetzt. Wieder einen Tag später wurde das normale Zellkulturmedium (MEM 10 % FCS mit Penicillin und Streptomycin) gegen das gleiche Medium mit 1 mg/ml Zeozin und 1,5 mg/ml Genetizin ausgetauscht. Das Selektionsmedium wurde im Folgenden alle 1 bis 3 Tage erneuert. Unter dem Mikroskop konnte man nach etwa einer Woche eine Veränderung der nicht Zeozin-Genetizin-resistenten Zellen beobachten: sie teilten sich nicht mehr, wuchsen zum Teil flächig aus oder bildeten lange Ausläufer. Nach 2 bis 3 Wochen hatten sich die nicht resistenten Zellen weitgehend abgelöst, und resistente Zellen waren nun zu mit bloßem Auge sichtbaren Kolonien herangewachsen. Diese wurden mit Hilfe von Klonierungsringsen isoliert und einzeln abtrypsiniert. 80 der abtrypsinierten Zellen wurden in Vertiefungen von 12-Well-Platten und 20 % der Zellen auf *chamber slides* (Objektträger, die mit 6-12 Plastikkammern besetzt sind zum gleichzeitigen Untersuchen verschiedener Zellen) ausgesät. Nachdem die Zellen in diesen *chamber slides* einen konfluenten Zellrasen ausgebildet hatten, wurde die Expression mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse (vgl. Kap. IV. 3.2.) untersucht und „Zellklone“ (nicht Klone im eigentlichen Sinne, da im seltensten Fall aus einer Zelle hervorgegangen) mit einem guten Expressionsmuster weiterkultiviert, untersucht und eingefroren.

Zum Herstellen von MDCK-Zellen, die die µ-Untereinheiten der AP-Komplexe (µ1A, µ1B, µ2, µ3A und µ4) stabil exprimieren, wurde wie oben beschrieben verfahren. Da

jedoch das Expressions-Plasmid pCG, in welches die Gene für die verschiedenen μ -Untereinheiten der AP-Komplexe inseriert war, keine zusätzliche Resistenz trägt, wurde nur mit Genetizin selektioniert.

2.4.2. Stabile Proteinexpression in MDCK-Zellen durch Transduktion mit retroviralen Pseudotypen

Da es mitunter sehr schwierig war, NiV G stabil exprimierende MDCK-Zellen mittels Lipofektion herzustellen, die ein sehr gutes Expressionsmuster aufwiesen, wurde auf eine weitere Methode der Herstellung stabil exprimierender Zellen zurückgegriffen: das retrovirale Gentransfersystem. Diese Methode wurde in unserer Arbeitsgruppe durch Dr. Stephanie Erbar etabliert. Hierbei werden Wirtszellen mit inaktiven, replikationsinaktiven Virionen infiziert, wodurch Fremd-DNA in die Zellen eingeschleust wird (Transduktion).

Es wurde das so genannte *transient three-plasmid expression system* ⁽¹⁴¹⁾ verwendet, wobei retrovirale Strukturgene, das Fremdgen und ein geeignetes Hüllprotein in 293T-Zellen transfiziert wurden, um nicht replikationsfähige Partikel zu produzieren, die jedoch noch die Fähigkeit besitzen, Fremd-DNA stabil auf Zielzellen zu übertragen. Grundlage dieses Gentransfersystems ist das bei neugeborenen Mäusen zur Ausbildung eines T-Zell-Lymphoms führende **Moloney Murine Leukemia Virus** (MoMLV). Die zur Transfektion der 293T-Zellen verwendeten Plasmid sind: pHIT 60, pczCFG5-NiV G und pczCFG5-VSV-G. Das pHIT 60-Plasmid kodiert für die zur Integration des viralen Genoms und die Virionbildung notwendigen Proteine und Enzyme gag und pol, die sich unter der Kontrolle eines CMV-Promotors befinden und einen SV40 *ori* besitzt. Das Plasmid pczCFG5-NiV G kodiert für die *genes of interest*, in diesem Fall das NiV Oberflächen-Glykoprotein G. Sie beinhalten zusätzlich ein Zeozin-Resistenzgen unter der Kontrolle eines SV40-Promotors. Die Gene in pczCFG5-NiV G werden von retroviralen LTRs (*long terminal repeats*) flankiert, welche dahingehend modifiziert sind, dass die 5'U3-Region, die normalerweise für einen retroviralen Promotor kodiert, gegen einen CMV-Promotor ausgetauscht wurde, so dass die Transkription der

integrierten viralen DNA über den CMV-Promotor gesteuert werden kann. Neben dem pczCFG5-Plasmid für das wildtypische G-Protein wurden noch Plasmide, die für die mutierten G-Proteine $G_{Y28/29}$ und $G_{L42/43A}$ kodieren, benutzt. Das dritte Plasmid, pczCFG5-VSV-G, ebenfalls unter der Kontrolle eines CMV-Promotors, kodiert für das Glykoprotein G des vesikulären Stomatitis-Virus (VSV), welches den gebildeten Pseudotypen als *envelope*-Protein dient und eine Rezeptorerkennung und damit das Eindringen der Pseudotypen in fast jeden Zelltyp ermöglicht. Die verwendeten Plasmide pczCFG-VSV-G und pHIT 60 wurden uns von Jürgen SchneiderSchaulies aus Würzburg freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Zur Einbringung der drei Plasmide in die 293T-Zellen wurde Polyethylenimine (PEI) verwendet. In den 293T-Zellen sollten nun, gesteuert über die gag-pol-Proteine, Viruspartikel gebildet werden, die das NiV G-Gen verpackt und in deren Hülle das VSV-G-Protein eingelagert ist. Diese Viruspartikel bezeichnet man als Pseudotypen, da sie zwar ein retrovirales Genom enthalten, aber von einem fremden Hüllprotein umgeben sind. Diese Pseudotypen werden nun zur Transduktion von Zielzellen verwendet, damit die Fremd-DNA in das Wirtsgenom integriert werden kann. Sie sind jedoch nicht replikationsfähig und bilden somit keine neuen infektiösen Partikel.

2.4.2.1. Transfektion von 293T-Zellen

Zur Transfektion von 293T-Zellen wurde in dieser Arbeit *Polyethylenimine* (PEI) verwendet. Das kationische Polymere PEI bindet und komplexiert die DNA über elektrostatische Interaktionen in stabile Komplexe, so genannte Polyplexe. Diese werden von den Zellen wahrscheinlich über Endozytose aufgenommen. Der genaue Mechanismus der DNA-Aufnahme ist jedoch noch nicht geklärt. Verwendet wurde dieses Transfektionsreagenz da es verglichen mit der üblichen Kalzium-Phosphat-Transfektion eine höhere Effizienz aufweist.

Am Vortag der Transfektion wurde mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahl einer konfluenten Kulturflasche 293T-Zellen bestimmt und 6×10^6 Zellen pro 10 cm-Kulturschale ausgesät. Da die 293T-Zellen mit Mykoplasmen kontaminiert waren

wurde dem Kulturmedium der ausgesäten Zellen *mycoplasma removal agent* (MRA) im Verhältnis 1:100 zugefügt.

Für eine 10 cm-Kulturschale wurden zwei Ansätze vorbereitet. Ansatz A beinhaltete die DNA bestehend aus 5 µg pHIT, 5 µg pczCFG5-NiV G und 5 µg pczCFG5-VSV- G. Dieses DNA-Gemisch wurde auf 700 µl Endvolumen mit DMEM ohne FCS und ohne Antibiotikum aufgefüllt. Für den Ansatz B wurde 45 µl PEI (1 mg/ml) mit DMEM ohne FCS und ohne Antibiotikum auf 700 µl Endvolumen aufgefüllt. Ansatz A und B wurden gemischt und 20 min bei RT inkubiert. In der Zwischenzeit wurde das Kulturmedium der Zellen durch DMEM ohne FCS und Antibiotikum ausgetauscht. Anschließend wurde das Transfektionsgemisch noch einmal gemischt und tropfenweise auf die Zellen gegeben. Nach 5-7 h Inkubation im Brutschrank bei 37 °C und 5 % CO₂ wurde das Medium gegen Kulturmedium mit 10 %FCS und Antibiotikum gewechselt.

Am nächsten Tag wurde die Transfektionseffizienz mittels Überprüfung der GFP-Fluoreszenz kontrolliert. Anschließend wurden die Zellen mit Natriumbutyrat in der Endkonzentration 10 mM behandelt. Natriumbutyrat verstärkt den CMV-Promotor des für das VSV-Glykoprotein kodierenden Expressionsplasmids.

Nach 8 h Inkubation bei 37 °C wurde erneut das Medium gewechselt und eine mikroskopische Kontrolle durchgeführt. Am darauf folgenden Tag wurde der Überstand, der die Pseudotypen enthält, geerntet und für eine nochmalige Ernte frisches Kulturmedium auf die Zellen gegeben. Der gewonnene Überstand wurde zum Entfernen von Zellrückständen für 15 min bei 4 °C und 3000^orpm zentrifugiert. Der Überstand wurde dann in ein Ultrazentrifugenröhrchen (SW41, Beckman) überführt und mit 1 ml 20 % Saccharose unterschichtet. Nach 2 h Zentrifugation bei 30.000 rpm und 4 Flee °C in der Ultrazentrifuge wurde der Überstand verworfen und die pelletierten Pseudotypen in 50 µl PBS++/1 % BSA aufgenommen. Die gereinigten Pseudotypen wurden bei -20 °C aufbewahrt oder direkt für die Transduktion von MDCK-Zellen verwendet.

Es wurden Pseudotypen hergestellt, die zum einen das Gen für das wildtypische NiV G-Protein (G_{wt}), sowie verschiedene Mutanten dieses Gens mit jeweils zwei Aminosäureaustauschen (G_{Y28/29A}, G_{L42/43A}) enthielten.

2.4.2.2. Transduktion von MDCK-Zellen

Für die Transduktion der MDCK-Zellen wurden diese am Vortag in die Vertiefungen einer 24-Well-Platte ausgesät und im Brutschrank über Nacht (ü.N.) inkubiert. Vor Zugabe der Pseudotypen wurden die Zellen mit Polybrene (0,8 mg/ml, 1:100 eingesetzt) behandelt. Polybrene sind Polykationen, die die elektrostatischen Abstoßungskräfte zwischen Virus und Zellmembran neutralisieren und somit die Effektivität der retroviralen Infektion signifikant (100-1000fach) steigern.⁽⁷⁸⁾

Im Anschluss wurden jeweils 10 µl der gereinigten Pseudotypen zu den Zellen getropft. Nach 5-8 h wurde das Medium durch normales Kulturmedium ersetzt.

Im Folgenden wurde mit den Zellen so verfahren, wie in Kap. IV. 2.4.1. beschrieben. Die stabil exprimierenden MDCK-Zellen wurden mittels Zeozin-haltigem Kulturmedium selektioniert und anschließend mit Klonierungsringen abtrypsiniert und weiterkultiviert.

2.5. Nipahvirus-Infektion

2.5.1. Infektion von Vero- oder MDCK-Zellen auf Deckgläschen

Alle NiV-Infektionen wurden im Hochsicherheitslabor (BSL-4) des Instituts für Virologie (Marburg) von Frau Dr. Sandra Diederich und Frau Dr. Stephanie Erbar durchgeführt.

Für die Infektion wurden Vero- oder MDCK-Zellen auf Deckgläsern so ausgesät, dass sie am Tag der Infektion ca. 70 % konfluent waren. Die Zellen wurden dann mit einer *multiplicity of infection* (MOI) von 1 infiziert. Nach einer Inkubation von 1 h bei 37 °C wurde das Inokulum entfernt, die Zellen zweimal gewaschen und mit frischem Zellkulturmedium mit 2 % FCS bei 37 °C kultiviert. 0 h, 8 h, 13 h, 16 h, 24 h, 39 h oder 48 h nach der Infektion (*postinfection*; p.i.) wurden Überstände für die Bestimmung des Virustiters im Zellkulturüberstand mittels TCID₅₀-Methode (vgl. Kap. IV. 2.5.3.) abgenommen. Die Deckgläschen für die indirekte Immunfluoreszenzanalyse (vgl. Kap. IV. 3.2.) wurden zweimal gewaschen und anschließend in 4 % Paraformaldehyd (PFA) ü.N. bei 4 °C inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Deckgläser in frische 1,5 cm-Schalen überführt und wiederum mit 4 % PFA versetzt. Zum Ausschleusen aus dem

BSL-4-Labor wurden die Schalen in der chemischen Dusche mit 5 % Microchem von außen desinfiziert. Außerhalb des BSL-4-Labors mussten die Deckgläser vor einer weiteren Verwendung nochmals für 24 h in 4 % PFA gelagert werden. Vor der Anfärbung der Antigene mittels indirekter Immunfluoreszenzanalyse wurden die Zellen dreimal mit PBS⁺⁺ gewaschen, dann für 1 h bei 4 °C in Zellkulturmedium mit 10 % FCS inkubiert, um mögliche unspezifische Bindungsstellen abzusättigen, und anschließend erneut mit PBS⁺⁺ gewaschen.

2.5.2. Infektion von polarisierten MDCK-Zellen auf Transwell-Filtern

Die Zellen wurden wie in Kap. IV. 2.2 beschrieben auf Transwell Filtern kultiviert. Für die Infektion wurde das Kulturmedium der konfluenten und polarisierten MDCK-Zellen abgenommen. In die apikale Kammer wurde das in DMEM ohne FCS verdünnte Virus (MOI 10) gegeben, während in die basale Kammer nur DMEM ohne FCS gegeben wurde. Nach 1,5 h Adsorption wurde das Inokulum von den Zellen genommen und frisches Medium mit 2 % FCS zugegeben. Anschließend wurde verfahren wie in Kap. IV. 2.5.1. beschrieben.

2.5.3. Bestimmung der Virustiter im Kulturüberstand mittels Endpunkttitration (TCID₅₀-Methode)

Zur Bestimmung der Virusmenge (Titer) einer Suspension wird bei der Endpunkttitration die höchste Verdünnungsstufe einer Viruslösung ermittelt, bei der 50 % der infizierten Kulturen einen zytopathischen Effekt (CPE) aufweisen. Hierbei reicht für die Infektion einer Zellkultur bereits ein infektiöses Viruspartikel aus. Der in dieser Verdünnung enthaltene Virustiter wird als *tissue culture infectious dose 50* (TCID₅₀) angegeben.

Die Quantifizierung der Nipahvirustiter im Zellkulturüberstand mittels TCID₅₀ wurde im BSL-4-Labor von Frau Dr. Sandra Diederich oder Frau Dr. Stephanie Erbar durchgeführt. Um den Virustiter zu ermitteln, wurden in jede Vertiefung einer 96-Loch-Platte 100 µl DMEM/2 % FCS vorgelegt. In die erste Vertiefung einer Reihe wurden 25 µl des

jeweiligen Zellkulturüberstandes gegeben und dann eine geometrische Verdünnungsreihe von 5^{-1} bis 5^{-12} hergestellt. Anschließend wurden 10^4 Vero-Zellen in 100 μ l DMEM mit 2 % FCS pro Vertiefung zugegeben. Für die Titerbestimmung wurden jeweils vier Parallelansätze hergestellt. Nach 5 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ wurden die Zellkulturen hinsichtlich ihres CPE betrachtet und der Nipahvirustiter als TCID₅₀ bestimmt.

3. Biochemische und immunologische Nachweismethoden

3.1. GFP-Fluoreszenz Nachweis

Die Plasmide, die für die NiV-Glycoproteine kodieren, besitzen zusätzlich ein Gen für ein *green fluorescent protein* (GFP). Somit kann man die Expression transient oder stabil transfizierter Zellen auch ohne indirekte Immunfluoreszenz nachweisen. Diese Eigenschaft kann man sich zu Nutze machen, wenn man z.B. nach erfolgter Transfektion deren Effizienz in lebenden Zellen untersuchen möchte. Hierfür wurden die Zellen in den entsprechenden Schälchen direkt mittels des Fluoreszenzmikroskops (Axiovert ApoTome, Fa. Zeiss) betrachtet.

Wenn die GFP-Fluoreszenz in fixiertem Zustand untersucht werden sollten, wurden die Zellen zunächst 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen und anschließend für 20 min bei RT mit 2 % PFA fixiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS⁺⁺ und anschließendem Waschen mit Wasser wurden die Zellen mit Mowiol eingedeckelt und nach dem Aushärten mit dem Fluoreszenzmikroskop betrachtet.

3.2. Indirekte immunfluoreszenzanalyse (IF)

Bei der indirekten Immunfluoreszenzanalyse können Antigene auf der Oberfläche von Zellen und nach Permeabilisieren auch im Zellinneren mittels spezifischer Antikörper (Primärantikörper) nachgewiesen werden. Nach Zugabe von spezifischen Fluoreszenzgekoppelten Sekundärantikörpern kann der Antigen-Antikörper-Komplex mit Hilfe

eines Fluoreszenzmikroskops detektiert werden. Fluoreszenzfarbstoffe besitzen die Eigenschaft, bei Bestrahlung mit kurzwelligem Licht (UV-Licht), Licht einer längeren Wellenlänge zu emittieren und somit das markierte Antigen sichtbar zu machen. Das Fluoreszenzsignal wird verstärkt, da an jeden gebundenen Primärantikörper mehrere Sekundärantikörper binden können.

3.2.1. IF zur Untersuchung der Lokalisation der NiV-Proteine in infizierten polarisierten MDCK Zellen

Auf Transwell-Filtern für 3-7 Tage polarisiert gewachsene MDCK Zellen wurden nach Infektion unter BSL-4 Bedingungen wie in Kap. IV. 2.5.1. beschrieben aus dem Hochsicherheitslabor ausgeschleust. Am folgenden Tag wurden die Filter zunächst mit PBS⁺⁺ gewaschen und dann für 1 h in DMEM/10 % FCS inkubiert. Anschließend wurden die Filter mittels eines Skalpell aus der Halterung gelöst und geviertelt. Je nachdem, wie viele unterschiedliche Färbungen gemacht wurden, wurden entsprechend viele Filterviertel weiterverarbeitet. Die restlichen Viertel wurden in PBS⁺⁺ bei 4 °C bis zur weiteren Verwendung gelagert.

Die entsprechenden Filterviertel wurden anschließend für 10 min mit 0,1M Glyzin in PBS⁺⁺ inkubiert um den durch lange Fixierung in PFA entstehenden Fluoreszenzhintergrund zu minimieren. Nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen mit einem anti-NiV-Serum aus einem infizierten Meerschweinchen (gp89, 1:500 in PBS⁺⁺/0,35 % BSA) zur Detektion beider NiV-Glykoproteine auf der Zelloberfläche inkubiert. Zur selektiven Färbung wurden monoklonale anti-F- (mab92 1:200 in PBS⁺⁺/0,35 % BSA) oder anti-G-Antikörper (mab26 1:200 in PBS⁺⁺/0,35 % BSA) aus immunisierten Kaninchen verwendet.⁽³⁾ Die Antikörper wurden uns freundlicherweise von Benhur Lee (USA) zur Verfügung gestellt. Die Inkubation erfolgte in der sogenannten feuchten Kammer, die aus einer Petrischale, ausgelegt mit einem befeuchteten Filterpapier und einem darüber liegenden Parafilm, besteht. Es wurden 20 µl der Antikörperverdünnung auf den Parafilm pipettiert, der Filter wurde mit der von Zellen bewachsenen Seite (apikale Seite der Zellen) nach unten auf den Tropfen Antikörper-

verdünnung gelegt und anschließend wurde auf die nun nach oben zeigende Seite des Filters (basale Seite der Zellen) ein weiterer Tropfen von 20 µl Antikörperverdünnung pipettiert. Nach einer Inkubationszeit von 2 h bei 4 °C wurden die Filterviertel in die Kulturschale zurück gelegt und 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen.

In einem zweiten Schritt wurde die Filterviertel, ebenfalls in der feuchten Kammer, entweder mit einem Rhodamin- oder einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper (1:200 in PBS⁺⁺) für 1,5 h bei 4 °C inkubiert. Zur Visualisierung der Zellkerne wurde dem Sekundärantikörper DAPI in einer 1:10000 Verdünnung hinzu gegeben.

Sollte gleichzeitig neben den NiV Glykoproteinen noch E-Cadherin als zelluläres Markerprotein für die Zellkontakte gefärbt werden, wurden die Zellen für 5 min bei RT mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) permeabilisiert. Die Filter wurden dann wie oben beschrieben in der feuchten Kammer für 2 h mit einem monoklonalen Antikörper gegen das *Adherens* Junction-Protein E-Cadherin (1:100 in PBS⁺⁺) inkubiert, gefolgt von einer 1,5 h langen Inkubation mit einem FITC- oder Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper.

Nach weiterem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Filterviertel in dH₂O geschwenkt und mit Mowiol eingedeckelt. Dazu wurden 10 µl Mowiol auf den Objektträger pipettiert, worauf das Filterviertel mit den Zellen nach oben platziert wurde. Auf die Oberseite des Filters, also auf die Zellen, wurden ebenfalls 10 µl Mowiol pipettiert. Anschließend wurde ein passendes viereckiges Deckglas möglichst blasenfrei auf den Filter gelegt und mit der Spitze einer Pinzette vorsichtig angedrückt. Zum Aushärten und Lagern wurden die Objektträger im Dunkeln bei 4 °C aufbewahrt. Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 200 ApoTome, Fa. Zeiss) oder einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (Axioplan 2 LSM510, Fa. Zeiss) untersucht.

3.2.2. IF-Färbung zum Nachweis der Glykoprotein-Expression in stabil transfizierten nicht-polaren Zellen

Zur Analyse der Expression der NiV-Glykoproteine wurden die stabil transfizierten MDCK-Zellen auf Deckgläschen ausgesät. Am folgenden Tag wurden die Zellen

zunächst 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen und unfixiert mit einem anti-NiV-Serum aus infizierten Meerschweinchen (gp3 1:500 in PBS⁺⁺/0,3 % BSA) und mit einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper (1:200 in PBS⁺⁺/0,3 % BSA) in der feuchten Kammer (beschrieben in Kap. IV. 3.2.1.) inkubiert. Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axioplan oder Axiovert ApoTome, Fa. Zeiss) betrachtet.

3.2.3. IF-Färbung von polarisierten MDCK-Zellen zur Untersuchung der Lokalisation der NiV Glykoproteine mittels konfokaler Mikroskopie

Zur Untersuchung der Verteilung der NiV Glykoproteine in polarisierten Epithelzellen wurden MDCK Zellen, die die NiV Glykoproteine stabil exprimieren auf Transwell-Filtern ausgesät. Nach 5-7 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ und täglichem Wechsel des Kulturmediums wurden die Filter 3x mit PBS⁺⁺ gewaschen. Anschließend wurde die Membran unter Verwendung eines Skalpell aus der Halterung heraus getrennt. Die Filter wurden geviertelt und entweder weiter verarbeitet wie Filter mit infizierten Zellen oder nach 20 min Inkubation mit 2 % PFA für spätere Färbungen in PBS⁺⁺ bei 4 °C aufbewahrt.

Zur Anfärbung der F- oder G-Proteine in stabil exprimierenden MDCK-Zellen wurden die Filter unfixiert für 2 h in der feuchten Kammer, wie in Kap. IV. 3.2.1, beschrieben mit einem anti-NiV-Serum aus einem infizierten Meerschweinchen (gp3, 1:500 in PBS⁺⁺/0,35 % BSA) und mit einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Präparate wurden mit einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (Axioplan 2 LSM510, Fa. Zeiss) untersucht.

3.2.4. IF-Färbung zur Untersuchung endogener Adaptorprotein(AP)- Komplexe in Vero- und MDCK-Zellen

Zum Etablieren einer Färbemethode zur Untersuchung der Lokalisation endogen exprimierter AP-Komplexe wurden MDCK- bzw. Vero-Zellen in die Vertiefungen von 24-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät und am folgenden Tag nach 3x Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen auf zweierlei Weise fixiert und permeabilisiert. Entweder

wurden die Zellen für 5 min mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) oder für 20 min mit 2 % PFA bei RT behandelt. Nach der PFA-Behandlung, die lediglich die Zellen fixiert, mussten diese mit 0,2 % Triton X100 für 10 min permeabilisiert werden. Um den unspezifischen Fluoreszenzhintergrund, der durch die PFA-Behandlung entsteht, zu reduzieren, wurden die Zellen außerdem mit 0,1 M Glyzin/PBS def für 10 min bei RT inkubiert. Nach nochmaligem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen in der feuchten Kammer wie in Kap. IV. 3.2.1. beschrieben mit kommerziell erhältlichen monoklonalen Antikörpern gerichtet gegen einzelne Untereinheiten der AP-Komplexe (AP-1: σ , Ap-2: μ , AP-3A: μ , AP-4: σ) inkubiert. Zum Austesten der optimalen Antikörperkonzentration wurden Verdünnungen von 1:10, 1:50, 1:100, 1:250 und 1:300 in PBS⁺⁺/0,35 % BSA verwendet. Dazu wurden 20 μ l der Antikörperverdünnung auf den Parafilm getropft und das Deckgläschen mit den Zellen nach unten auf den Tropfen gelegt. Nach 1 h Inkubation bei 4 °C wurden die Deckgläschen mit PBS⁺⁺ gewaschen und im zweiten Schritt mit einem Alexa Fluor 568- oder 488-gekoppelten Sekundärantikörper für 45 min in der feuchten Kammer inkubiert. Nach erneutem Waschen mit PBS⁺⁺ und kurzem Schwenken in dH₂O wurden die Deckgläschen mit Mowiol eingedeckelt und zum Aushärten über Nacht bei 4 °C im Dunkeln aufbewahrt. Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert ApoTome, Fa. Zeiss) betrachtet. Hierbei stellte sich heraus, dass die Färbung der endogenen AP-Untereinheiten für MDCK-Zellen nicht möglich war. Für Vero-Zellen wurden die optimale Fixierung/Permeabilisierung mit Methanol/Aceton (1:1) und die beste Antikörperverdünnung von 1:100 festgestellt.

3.2.5. IF-Färbung zur Untersuchung transient exprimierter Adaptor proteine(AP)-Komplexe mit einem c-terminalen Flag-tag in Vero- und MDCK-Zellen

Zur Untersuchung der Lokalisation transient exprimierter Adaptor Proteine wurden die Zellen in die Vertiefungen von 24-Well-Platten auf Deckgläschen ausgesät und am folgenden Tag wie in Kap. IV. 2.3.1. beschrieben transfiziert. Hierfür wurde jeweils 1 μ g DNA und 1,5 μ l LFA verwendet. Nach ca. 24 h Expression wurden wie Zellen 3x mit

PBS⁺⁺ gewaschen und zum Permeabilisieren für 5 min mit einkaltem Methanol/Aceton (1:1) behandelt. Nach nochmaligem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen wie in Kap. IV. 3.2.11 beschrieben in der feuchten Kammer mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Flag-tag (1:100 in PBS⁺⁺/0,35 % BSA) und im zweiten Schritt mit einem Alexa Fluor 568- oder 488-gekoppelten dem Sekundärantikörper inkubiert. Die Präparate wurden mit einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (Leica SP5, Fa. Leica) untersucht.

3.3. Etablierung eines Fusions-Assays zum Nachweis des Einflusses der basolateralen Expression der NiV Glykoproteine in polaren MDCK-Zellen

Um den Einfluss der basolateralen Expression der NiV Glykoproteine in polaren MDCK-Zellen zu untersuchen, wurde in dieser Arbeit ein Fusions-Assay etabliert. Werden die fusogenen NiV Glykoproteine F und G und deren Tyrosin- oder Leucinmutanten in nicht polaren MDCK-Zellen koexprimiert, sollte es in jedem Fall zu einer Zell-Zell-Fusion kommen, d.h. es sind mittels indirekter Immunfluoreszenz Synzytien zu detektieren. Werden die NiV Glykoproteine in polaren MDCK-Zellen koexprimiert, tritt nur noch Zell-Zell-Fusion auf, wenn beide fusogenen Glykoproteine an der basolateralen Membran exprimiert werden.

3.3.1. Fusions-Assay in nicht-polaren MDCK-Zellen

Für den folgenden Versuch wurden stabil F_{wt}-exprimierende MDCK-Zellen (100 % positiver Klon) subkonfluent auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag mit den Plasmiden pczCFG5 NiV G_{wt}, pcz CFG5 NiV G_{Y28/29A}, pcz CFG5 NiV G_{L41/42A} transfiziert (vgl. Kap. IV. 2.3.1). Nach 24 h Inkubation wurden die Deckgläschen wie in Kap. IV. 3.2.2. beschrieben mit einem monoklonalen anti-F-Antikörper (mab92 1:200 in PBS⁺⁺/0,35 % BSA) und mit dem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper in der feuchten Kammer (beschrieben in Kap. IV. 3.2.1.) inkubiert. Die Präparate wurden mit einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert ApoTome, Fa. Zeiss) betrachtet.

3.3.2. Fusions-Assays in polarisierten MDCK-Zellen

Um die Fusionsaktivität der NiV Glykoproteine in stabil exprimierenden polarisierten MDCK-Zellen zu untersuchen, wurden stabil F_{wt^-} und F_{Y525A^-} -exprimierende MDCK-Zellen konfluent auf Transwell-Filtern ausgesät. Nach 5 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 und täglichem Wechsel des Kulturmediums wurden die Zellen nach einer kurzen Behandlung mit 0,05 % Trypsin/0,53 mM EDTA transfiziert (vgl. Kap. IV 2.3.2). Nach gründlichem Waschen der Filter mit PBS def wurden dafür in die apikale und basale Kammer für 10 min 1 ml 0,05 % Trypsin/0,53 mM EDTA gegeben. Zum Stoppen der Reaktion wurde Medium mit 10 % FCS gegeben, gefolgt von einer Überprüfung des transepithelialen Widerstandes nach Wechsel gegen frisches Medium. Vor der Trypsinbehandlung wurde der Transfektionsansatz wie in Kap. IV. 2.3.2. beschrieben angesetzt. Hierbei wurden 10 µg DNA (pczCFG5 $G_{L42/43A}$ und pczCFG5 $G_{Y28/29A}$) und 15 µl LFA eingesetzt. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO_2 und täglichen Mediumwechsel, kombiniert mit einer Überprüfung des transepithelialen Widerstandes, wurden die Filter 3x mit PBS^{++} gewaschen. Anschließend wurde die Membran aus der Halterung unter Verwendung eines Skalpells heraus getrennt. Die Filter wurden geviertelt und entweder weiterverarbeitet oder nach 20 min Inkubation mit 2 % PFA für spätere Färbungen in PBS^{++} bei 4 °C aufbewahrt.

Im Weiteren wurden die Filter im ersten Schritt in der feuchten Kammer wie in Kap. IV. 3.2.3. beschrieben mit einem G-spezifischen monoklonalen Antikörper (mab26 1:200 in $PBS^{++}/0,3\%$ BSA) für 2 h inkubiert. Nach 3x Waschen mit PBS^{++} wurden die Zellen mit einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper für 1,5 h in der feuchten Kammer bei 4 °C inkubiert. Nach Permeabilisieren mit eiskaltem Methanol/Aceton (1:1) für 5 min bei RT wurden die Zellen mit einem monoklonalen Antikörper gegen das *Adherens Junction*-Protein E-Cadherin (1:100 in $PBS^{++}/0,3\%$ BSA) für 2 h bei 4 °C in der feuchten Kammer inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper für 1,5 h. Zum Nachweis der 100 %igen Expression der stabil F_{wt^-} und F_{Y525A^-} -MDCK-Zellen wurden parallel andere Viertel des gleichen Filters mit einem F-spezifischen monoklonalen Antikörper (mab92 1:200 in

PBS⁺⁺/0,3 % BSA) für 2 h inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper für 1,5 h bei 4 °C in der feuchten Kammer.

Für Doppelfärbungen der zum Einen stabil und zum Anderen transient transfizierten NiV Glykoproteine wurden die F_{wt} bzw. G_{wt} stabil exprimierenden MDCK-Zellen konfluent auf Transwell-Filtern ausgesät. Nach 5 Tagen Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ und täglichem Wechsel des Kulturmediums wurden die Zellen wie in Kap. IV. 2.3.2. beschrieben mit 0,05 % Trypsin/0,53 mM EDTA behandelt und danach mit Plasmiden, die für G_{wt} bzw. F_{Y525A} kodieren (pczCFG5 F_{wt} und pczCFG5 F_{Y525A}) transfiziert. Nach 48 h Inkubation bei 37 °C und 5 % CO₂ und täglichem Mediumwechsel mit Kontrolle des transepithelialen Widerstandes wurden die Filter nach dreimaligem Waschen mit PBS⁺⁺ aus der Halterung mittels eines Skalpell heraus gelöst, geviertelt und entweder direkt weiterverarbeitet oder nach 20 minütiger Fixierung in 2 % PFA in PBS⁺⁺ gewaschen und aufbewahrt. Im ersten Schritt wurden die Filter mit einem F- bzw. G-spezifischen monoklonalen Antikörper (mab92 bzw. mab26 1:200 in PBS⁺⁺/0,3 % BSA) von beiden Seiten für 2 h in der feuchten Kammer wie in 3.2.3 beschrieben inkubiert. Nach 3x Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen von beiden Seiten mit einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper für 1,5 h in der feuchten Kammer inkubiert. Nach 3x Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen zur Absättigung noch freier Bindungsmöglichkeiten an den Antigen-Antikörper-Komplexe mit einem Kaninchenserum (1:20 in PBS⁺⁺/0,3 % BSA) für 30 min bei 4 °C in der feuchten Kammer von beiden Seiten inkubiert. Nach wiederholtem Waschen mit PBS⁺⁺ wurden die Zellen zum Nachweis des transient transfizierten Proteins (G_{wt}, F_{Y525A}) von beiden Seiten mit einem G- bzw. F-spezifischen monoklonalen Antikörper (mab26 bzw. mab92 1:200 in PBS⁺⁺/0,3 % BSA) in der feuchten Kammer für 2 h inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper für 1,5 h bei 4 °C in der feuchten Kammer. Danach wurden die Filter wie in 3.2.3 beschrieben mit Mowiol eingedeckelt und mittels eines konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop (Leica SP5, Fa. Leica) untersucht.

V. Ergebnisse

1. Infektion von polarisierten MDCK-Zellen

Es ist bekannt, dass polarisierte Epithelzellen für den Verlauf und die Ausbreitung einer Infektion von entscheidender Bedeutung sind. In immunhistochemischen Untersuchungen *in vivo* konnten virus-positive Epithelzellen sowohl in der Lunge, als auch in der Niere detektiert werden.⁽⁹¹⁾ Für die Untersuchungen in dieser Arbeit wurden MDCK-Zellen verwendet, eine etablierte Zelllinie aus der Niere des Hundes, die den *in vivo* infizierten Epithelzellen sehr nahe kommt.

1.1. Untersuchung NiV-infizierter MDCK-Zellen durch indirekte Immunfluoreszenzanalyse

Um die Ausbreitung der Infektion in Zellkultur zu untersuchen, wurden MDCK-Zellen auf Transwell-Filtern ausgesät und über fünf Tage kultiviert. Täglich wurde das Kulturmedium gegen frisches Medium getauscht und die Ausbildung der Polarität durch Messung des transepithelialen Widerstandes verfolgt. Nach fünf Tagen konfluentem Wachstum wurden die Zellen im BSL-4 Labor mit NiV infiziert (Dr. Stephanie Erbar). 18 bzw. 24 Stunden später wurden die Filter für 48 h mit 4 % PFA fixiert, um die Viren zu inaktivieren. Nach Ausschleusen aus dem Hochsicherheitslabor wurden die Zellen sowohl von der apikalen als auch von der basalen Seite mit einem polyklonalen anti-NiV Serum und einem Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt (vgl. Kap. IV. 3.2.1.). Zur Darstellung der Zell-Zell-Kontakte wurde nach Permeabilisieren und Fixieren der Zellen mit Methanol/Aceton mit einem monoklonalen Antikörper gegen E-Cadherin und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper gefärbt. Untersucht wurden die Präparate mit einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop Axioplan 2 LSM510 der Fa. Zeiss. Wie in Abb. V.1. zu sehen, sind MDCK-Zellen gut mit NiV infizierbar. Weiterhin ist zu erkennen, dass die Infektion in

MDCK-Zellen zur Ausbildung sogenannter *foci* führt. Diese *foci* umfassen zum Zeitpunkt 18 h p.i. im Durchschnitt ca. 20 Zellen, wohingegen es 25 h p.i. (*post infection*, nach Infektion) schon ca. 50 Zellen sind. Die Bildung der *foci*, oder auch Synzytien genannt, zeigt eindeutig, dass sich die NiV-Infektion von Zelle zu Zelle ausbreiten kann. Dies kann einerseits über Virusfreisetzung und Neuinfektion von Nachbarzellen oder über Ausbreitung über die lateralen Zellverbindungen passieren.

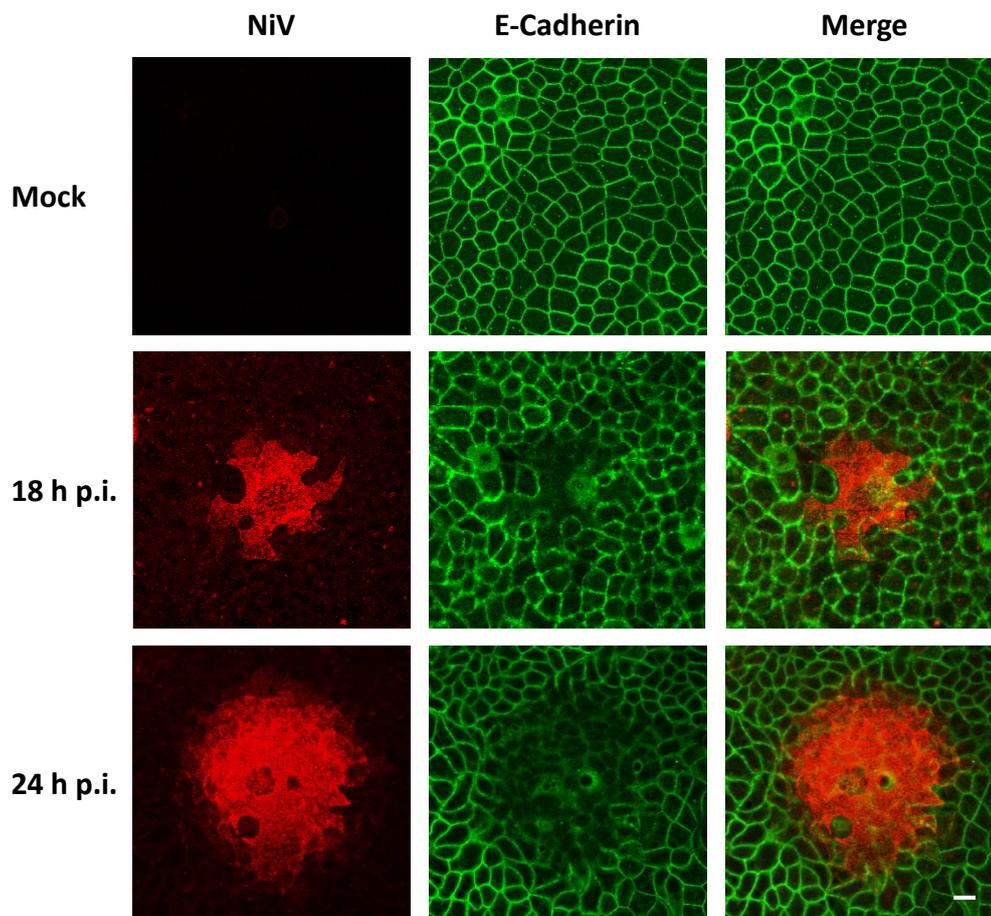
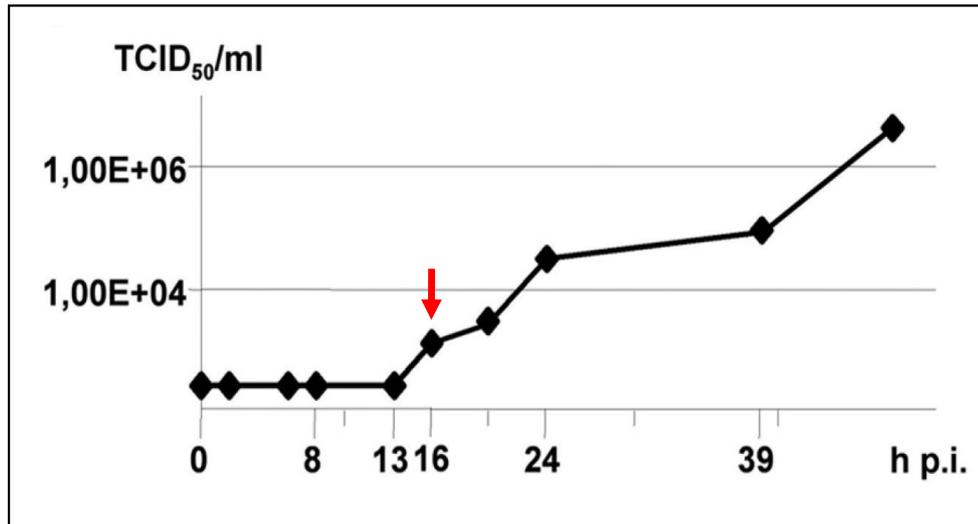


Abb. V.1.: Infektion von polarisierten MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden auf Transwell-Filter ausgesät und für 5 Tage bis zum Ausbilden der vollständigen Polarität kultiviert. Dann wurden die Zellen entweder mit NiV infiziert oder uninfiziert mitgeführt (Mock). Nach 18 h p.i. sowie 24 h p.i. wurden die Zellen für 48 h mit 4 % PFA fixiert. Anschließend wurden die Zellen mit einem NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3, 1:500) und Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper von der apikalen und basalen Seite gefärbt. Nach Permeabilisieren und Fixieren mit Methanol/Aceton wurden die Zell-Zell-Kontakte mittels eines monoklonalen Antikörpers gegen E-Cadherin und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper dargestellt. Axioplan 2 LSM510 Fa. Zeiss, Vergrößerung: x630, Balken: 10 µm

Für die Ausbreitung der Infektion über die lateralen Membranen der Zellen auf nicht infizierte Nachbarzellen spricht die Tatsache, dass innerhalb der *foci* die Verteilung des Zellkontaktproteins E-Cadherin verändert ist. Wie in Abb. V.1. (18 h p.i. und 24 h p.i.) zu sehen, ist hier in den infizierten Zellen die Grünfärbung fast völlig verschwunden.

Um die Frage zu klären, ob die Synzytien durch Neuinfektion benachbarter Zellen oder durch Glykoprotein-vermittelte Zell-Zell-Fusion entstehen, wurden polarisierte MDCK-Zellen nach fünf Tagen Wachstum auf Transwell-Filtern mit NiV infiziert. Mittels der TCID₅₀-Methode (vgl. Kap. IV. 2.5.3.) wurde 0, 2, 6, 8, 13, 16, 20, 39 und 48 h p.i. die Anzahl der zellfreien Viren im Medium der apikalen Kammer des Transwell-Filters bestimmt (Dr. Stephanie Erbar). Zu den gleichen Zeitpunkten wurde je ein Filter wie in Kap. IV. 2.5.1. beschrieben mit 4 % PFA für 48 h fixiert, aus dem Hochsicherheitslabor ausgeschleust und mit einem polyklonalen anti-NiV Meerschweinchenserum (gp3) und einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper von der apikalen und basalen Seite behandelt (Kap. IV. 3.2.1.). Wie in Abb. V.2.A zu sehen, ist zellfreies Virus im Medium der apikalen Kammer erst 16 h p.i. (Abb. V.2.A 16 h p.i., Pfeil) zu detektieren, während *foci*-Bildung bereits nach 13 h p.i. zu erkennen ist (Abb. V.2.B 13 h p.i., roter Kasten). Es ist erstaunlich, dass zu früheren Zeitpunkten in der Infektion (8 bis 16 h p.i.) keine einzelnen viruspositiven Zellen zu finden sind, sondern ab 13 h p.i. direkt *foci* mit mindestens 5 Zellkernen beobachtet werden. Dies unterstreicht die Vermutung, dass es sich um eine schnelle Ausbreitung des Virus über die Fusion der lateralen Membranen vermittelt durch die fusogenen NiV-Glykoproteine und nicht über die Virusfreisetzung und Neuinfektion von Nachbarzellen handelt.

A



B

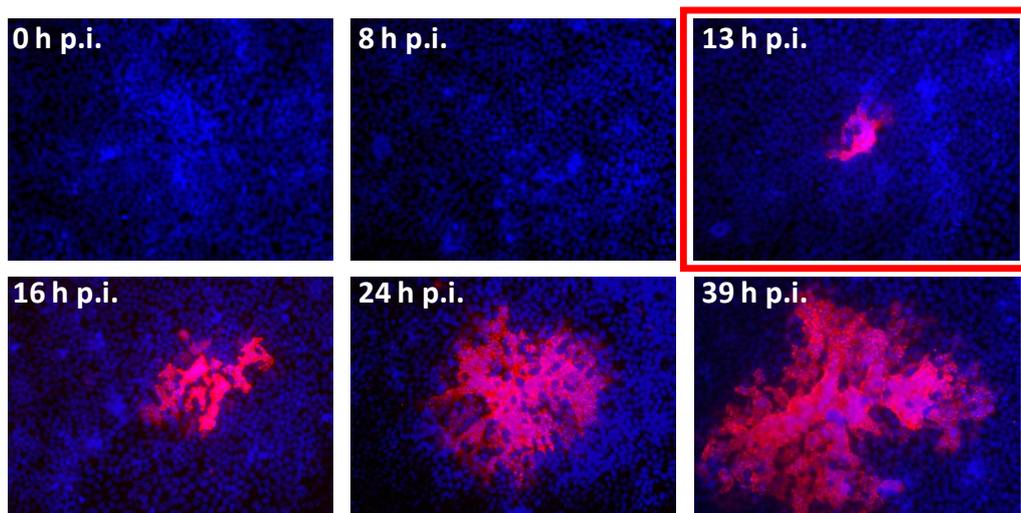


Abb. V.2.: NiV-Freisetzung und Synzytienbildung zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. in polarisierten MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden für 5 Tage bis zum Ausbilden einer vollständigen Polarität auf Transwell-Filtern kultiviert. Dann wurden sie mit NiV mit einer MOI von 10 infiziert (A) Der Virustiter wurde mittels der TCID₅₀-Methode zu den Zeitpunkten 0, 2, 6, 8, 13, 16, 20, 24, 39 und 48 h ermittelt. Der Anstieg des Virustiters ist durch den Pfeil verdeutlicht. (B) Zur Darstellung der Synzytienbildung wurden zu den angegebenen Zeitpunkten p.i. die mit 4 % PFA fixierten und inaktivierten Zellen, nach Permeabilisierung mit Methanol/Aceton, mit einem NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3, 1:500) und einem Alexa Fluor 568-konjugierten Zweitantikörper behandelt. Zur Darstellung der Zellkerne wurden die Zellen mit DAPI inkubiert. Gezeigt sind hier die Zeitwerte 0, 8, 13, 16, 24 und 39 h p.i.. Axiovert 200M ApoTome Fa. Zeiss, Vergrößerung: x200

1.2. Verteilung der NiV-Glykoproteine in infizierten MDCK-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Synzytienbildung durch Fusion der lateralen Membranen benachbarter MDCK-Zellen entstehen, wurde die Verteilung der beiden fusogenen NiV-Glykoproteine F und G auf der Oberfläche infizierter Zellen untersucht. Nur, wenn F und G lateral exprimiert werden, kann es zur Zell-Zell-Fusion kommen. Hierfür wurden vollständig polarisierte MDCK-Zellen mit NiV infiziert, nach 18 h p.i. mit 4 % PFA für 48 h fixiert und inaktiviert und nach Ausschleusen aus dem Hochsicherheitslabor mit spezifischen monoklonalen Antikörpern gerichtet gegen das NiV F oder G (mAb92 bzw. mAb26) von der apikalen und basalen Seite behandelt. Untersucht wurden die Präparate mit einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop Axioplan 2 LSM510 der Fa. Zeiss. In Abb. V.3. sind Synzytien zu sehen, in denen (A) das NiV F-Protein bzw. (B) das NiV G-Protein nachgewiesen wurde. Links sieht man jeweils für F und G einen horizontalen Schnitt (xy) durch den Zellrasen im apikalen Bereich. Rechts sind vertikale Schnitte (xz) durch den Zellrasen dargestellt, deren Positionen durch Linien im linken Bild angedeutet sind.

Wie in den vertikalen Schnitten 1, 2 und 3 zu sehen, ist sowohl das F- (A), als auch das G-Protein (B) in Synzytien hauptsächlich auf der apikalen Seite zu detektieren. Darüberhinaus ist an den lateralen Membranen, sowie an der basalen Membran eine gewisse Menge an Glykoprotein nachzuweisen (Pfeile), was auf eine bipolare Verteilung der NiV-Glykoproteine F und G hinweist. Die laterale Färbung konnte in den Synzytien nur am Rand zu benachbarten uninfizierten Zellen nachgewiesen werden. Dies und die Tatsache, dass in den Synzytien die E-Cadherin-Färbung (Abb. V.1) fehlt, unterstützen das Modell, dass es sich bei der Synzytien-Bildung um eine F- und G-vermittelte Zell-Zell-Fusion handelt.

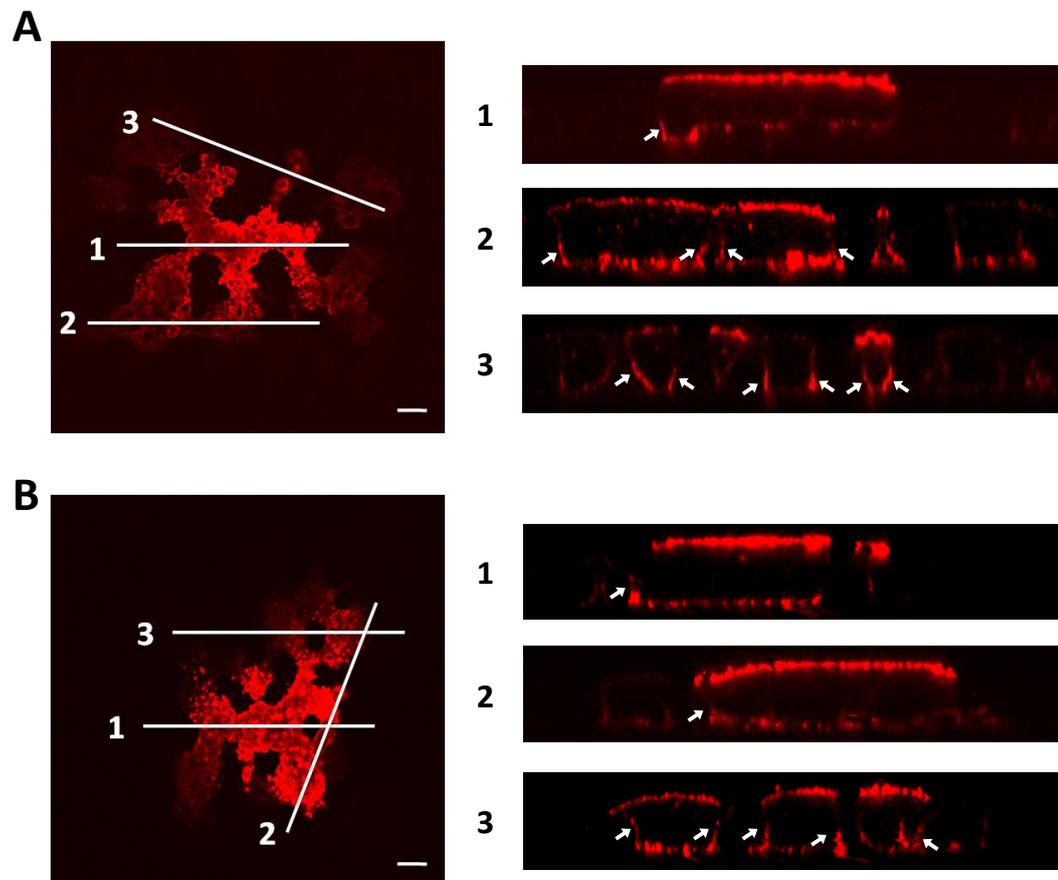


Abb. V.3.: Verteilung von F- und G-Proteinen in NiV-induzierten Synzytien. MDCK-Zellen wurden bis zur Ausbildung einer vollständigen Polarität für 7 Tage auf Transwell-Filtern kultiviert und dann mit NiV infiziert. Nach 18 h p.i. wurden die Zellen mit 4 % PFA für 48 h fixiert und inaktiviert und nach Ausschleusen aus dem Hochsicherheitslabor von der apikalen und basalen Seite mit einem monoklonalen Antikörper gegen (A) das F-Protein (mab92, 1:250) oder (B) das G-Protein (mab26, 1:250) inkubiert, gefolgt von einer Inkubation mit einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Zweitantikörper. (Links) Konfokaler horizontaler (xy) Schnitt durch den apikalen Teil des Zellrasens. (Rechts) Vertikale (xz) Schnitte durch die Synzytien entsprechend der angedeuteten Linien im Bild rechts. Pfeile deuten die laterale Membran an. Axioplan 2 LSM510 Fa. Zeiss, Vergrößerung: x630, Balken: 10 μm .

2. Polarität der NiV-Glykoproteine in transient und stabil transfizierten MDCK-Zellen

Da nun durch die Infektionsversuche bekannt war, dass die NiV-Glykoproteine in NiV-positiven Synzytien an den Rändern zu nicht-infizierten Zellen lateral exprimiert werden und somit eine Zell-Zell-Fusion hervorgerufen werden kann, sollte die

Verteilung des F- und des G-Proteins in der Einzelexpression in Abwesenheit anderer viraler Proteine und des durch das Virus hervorgerufenen zytopathischen Effekts, untersucht werden. Hierfür wurde zunächst die Verteilung der beiden Proteine auf der Oberfläche in transient, später in stabil transfizierten polarisierten MDCK-Zellen analysiert.

2.1. Transiente Expression der NiV-Glykproteine in polarisierten MDCK-Zellen

Wie in Kapitel IV. 2.3.2. beschrieben, müssen polarisierte MDCK-Zellen vor Zugabe der Transfektionsansätze (DNA + LFA) mit 0,05 % Trypsin/0,53 mM EDTA behandelt werden, damit sich die *tight* und *adherens junctions* auflösen, die die Plasmamembran polarisierter MDCK-Zellen in eine apikale und basolaterale Domäne trennen. Nach Überprüfung des Absinkens des transepithelialen Widerstandes (von ca. 100 Ω vor der Behandlung mit 0,05 % Trypsin/0,53 mM EDTA auf 10 Ω), was ein Auflösen der *junctions* bedeutet, wurde der Transfektionsansatz auf die Zellen pipettiert. Für die Transfektion verwendet wurden die NiV F_{wt}⁻ und G_{wt}⁻-Proteine, deren Gene in das Expressionsplasmid pczCFG5 inkloniert waren. Nach ca. 6 h wurde der Transfektionsansatz gegen frisches Kulturmedium getauscht und der transepitheliale Widerstand gemessen. Zu diesem Zeitpunkt war dieser schon wieder auf ca. 80 Ω gestiegen, was deutlich macht, dass sich die *tight junctions* geschlossen hatten. Nach 24 h p.t. (*post transfection*, nach Transfection) wurde erneut der transepitheliale Widerstand gemessen, um sicher zu gehen, dass sich eine vollständige Polarität ausgebildet hatte. Die Zellen wurden wie in Kapitel IV. 3.2.3 beschrieben mit einem polyklonalen anti-NiV Meerschweinchenserum (gp3) sowie einem Rhodamin-gekoppelten Zweitantikörper von der apikalen und der basalen Seite inkubiert. Untersucht wurden die Präparate mit einem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskop Axioplan LSM510 der Fa. Zeiss.

Wie in Abb. V.4. zu sehen, ist bei beiden wildtypischen Glykoproteinen eine Fluoreszenz im apikalen, medialen und basalen Bereich der Zellen nachweisbar. Beide

Proteine werden bipolar, also sowohl auf der basolateralen, als auch auf der apikalen Membrandomäne von polarisierten MDCK-Zellen exprimiert.

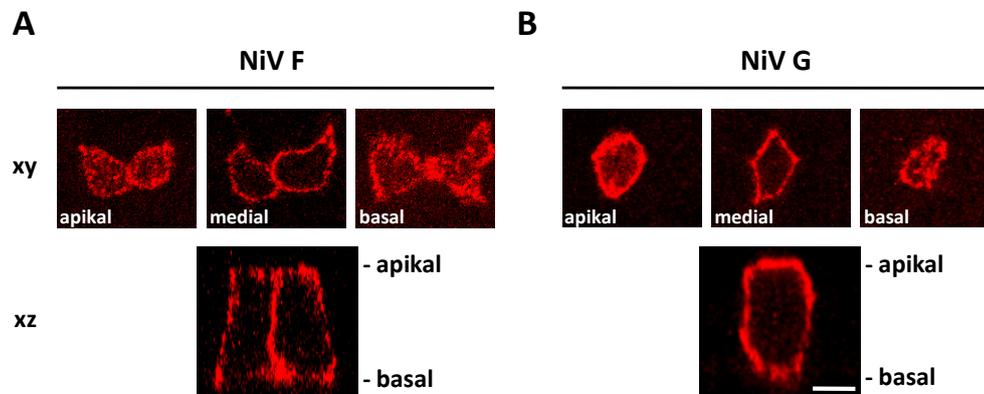


Abb. V.4.: Verteilung von transient exprimierten wildtypischen NiV-Glykoproteine auf der Oberfläche von polarisierten MDCK-Zellen. 5 Tage nach Aussäen der MDCK-Zellen auf Transwell-Filtern wurden die vollständig polarisierten Zellen mit den Plasmiden kodierend für (A) F_{wt} und (B) G_{wt} transfiziert. 48 h p.t. wurden die Zellen unfixiert mit einem polyklonalen NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3, 1:500) und mit einem Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Konfokale horizontale Schnitte von apikal, medial und basal (xy), sowie ein vertikaler Schnitt durch die Zellen (xz) sind gezeigt. Axioplan 2 LSM510 Fa. Zeiss, Vergrößerung: x630, Balken: 10 µm.

Der Nachteil einer transienten Expression in MDCK-Zellen liegt vor allem in der geringen Transfektionseffizienz (2-5 %) dieser Zellen. Dies ist vor allem durch die Ausbildung der Polarität und der damit verbundenen schweren Zugänglichkeit des Transfektionsreagenz-DNA-Gemisches an den basolateralen Bereich der Zelle bedingt. Aber auch wenn die MDCK-Zellen vor der transienten Transfektion mit 0,05 % Trypsin/0,53 mM EDTA behandelt werden um die *junctions* aufzulösen und somit ein Vordringen des Transfektionsgemisches in die Zwischenräume zu gewährleisten, kann die Transfektionseffizienz nur um einige Prozent gesteigert werden. Ein negativer Nebeneffekt dieser Trypsinbehandlung ist außerdem, dass die über fünf Tage aufgebaute Polarität der MDCK-Zellen durch die Trypsinbehandlung für einen gewissen Zeitraum verloren geht und es fraglich ist, ob dieser sich bis zur Färbung der Präparate nach 24 h wieder vollständig aufgebaut hat, man also eine vollständig polare Verteilung der transient transfizierten Proteine sehen kann. Hinzu kommt, dass Proteine, die transient exprimiert werden, häufig stark überexprimiert

sind. Dies kann dazu führen, dass die zelluläre Sortierungs- und Transportmaschinerie völlig überlastet wird und eine gerichtete Verteilung der Proteine gestört ist.

2.2. Erzeugung stabil exprimierender MDCK-Zellen durch Lipofektion

Um die gleichmäßige Proteinexpression ohne Überexpression, sowie ausreichend positive Zellen zu bekommen, wurden stabil exprimierende MDCK-Zellen hergestellt. Dies geschah wie in Kap. II 2.4.1. beschrieben durch Lipofektion. Von Carola Vogt⁽¹⁵⁰⁾ wurden MDCK-Zellen, die das NiV-F stabil exprimieren, übernommen. Da es keine MDCK-Zellen gab, die das NiV-G in einer zufriedenstellenden Menge exprimierten, wurden in dieser Arbeit MDCK-Zellen hergestellt, die dieses Protein stabil exprimieren. Für die Transfektion wurde das Expressionsplasmid pczCFG5⁽⁸²⁾ verwendet, welches einen CMV-Promotor besitzt und neben dem NiV G-Gen für ein Fusionsprotein bestehend aus Zeozin-Resistenz und GFP (*green fluorescent protein*) kodiert. Durch Zugabe von Zeozin können die stabil transfizierten Zellen selektioniert werden und positive Zellen lassen sich mittels GFP auch in unfixiertem und ungefärbtem Zustand detektieren. Nach Selektion der stabilen Zellklone wurden die Zellen mit einem polyklonalen anti-NiV Meerschweinchenserum (gp3) und einem Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert, um die Expression zu überprüfen. Nach Auswertung der Präparate am Mikroskop wurden die besten Klone, d.h. die Klone mit den meisten positiven Zellen, weiterkultiviert und untersucht. Dabei entstanden Klone mit sehr unterschiedlichem Expressionsmuster, von denen lediglich der Klon #2 (Abb. V.5.) weiterkultiviert und für die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren wurde. Wie in Abb. V.5. zu sehen, weisen die einzelnen Zellen dieses G-stabilen Zellklons eine sehr unterschiedliche Intensität der GFP- und Oberflächen-Fluoreszenz auf, was bedeutet, dass es sich bei diesen Zellen nicht im eigentlichen Sinne um einen Klon handelt. Wären alle Zellen aus einer positiven Zelle entstanden, wären sie also Klone dieser Zelle, würden alle Zellen das gleiche Expressionsmuster aufweisen. Da das hier nicht der Fall ist, kann davon ausgegangen werden, dass es sich um einen sogenannten Mischklon handelt. Diese Eigenschaft ist jedoch von Vorteil, da diese heterogene Expression eine Untersuchung der

Proteinverteilung in Abhängigkeit des Expressionslevels erlaubt. Die restlichen Klone wurden wegen sehr geringer Expression bzw. sehr wenigen positiven Zellen verworfen.

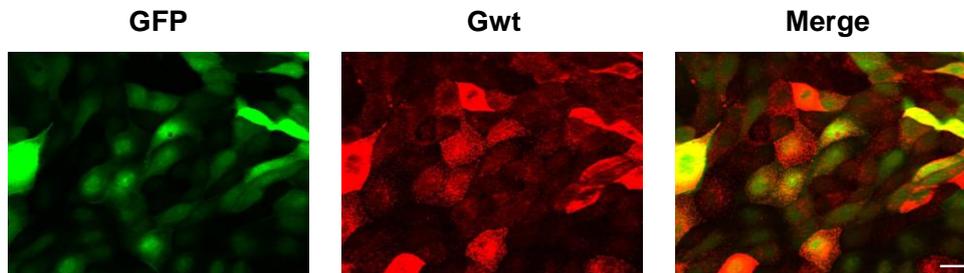


Abb. V.5.: Untersuchung der Oberflächenexpression des durch Lipofektion hergestellten stabil G_{wt} exprimierenden MDCK-Klon #2. Die durch Lipofektion hergestellten stabil G_{wt} exprimierenden MDCK-Zellen wurden auf *chamber slides* ausgesät und nach 24 h unfixiert mit einem polyklonalen NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3, 1:500) und mit einem Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Gezeigt ist die GFP-Fluoreszenz (grün) und das Antikörpersignal (rot). Axiovert 200M ApoTome Fa. Zeiss, Vergrößerung: x630, Balken: 20 μ m

2.3. Herstellung stabil exprimierender MDCK-Zellen durch retrovirale Pseudotypen

Da die Transfektion durch Lipofektion häufig zu einer zu geringen Transfektionseffizienz führt, sollte parallel versucht werden, stabil exprimierende MDCK-Zellen durch retroviralen Gentransfer herzustellen (vgl. Kap. IV. 2.4.2.). Das sogenannte *transient three-plasmid expression system* nach Emi et al.⁽⁴¹⁾ und Soneoka et al.⁽¹⁴¹⁾ wurde in unserer Arbeitsgruppe von Dr. S. Erbar in ihrer Doktorarbeit für PAEC-Zellen etabliert.

Nach Transfektion der 293T-Zellen mit den Plasmiden pHIT60, pczCFG-VSV-G und pczCFG-NiV-G durch Verwendung von PEI (vgl. Kap. IV. 2.4.2.1.) wurden die Zellen am folgenden Tag mit Natriumbutyrat in der Endkonzentration von 10 nM behandelt. Dies führt dazu, dass der CMV-Promotor des pHIT60 verstärkt wird und mittels der gag-pol-Proteine werden Viruspartikel gebildet, die auf ihrer Oberfläche das VSV-G-Protein enthalten. Am nächsten Tag konnte dann der pseudotyphaltige Überstand abgenommen, aufgereinigt und zur Transduktion (Infektion mit replikationsinaktiven Virionen) von MDCK-Zellen verwendet werden (vgl. Kap. IV.

2.4.2.2.). Zur Steigerung der Transduktionseffizienz wurde dem Medium der MDCK-Zellen nach der Transduktion Polybrene (0,8 mg/ml) hinzugefügt.⁽⁷⁸⁾ Nach zwei Tagen wurde, wie in Kap. IV.2.4.1. beschrieben, mit der Selektion der positiven Zellen über Zugabe von Zeozin in das Wachstumsmedium begonnen. Dies führte dazu, dass die nicht transduzierten Zellen starben, während sich die transduzierten vermehren konnten. Nach zwei bis drei Wochen konnten die GFP-positiven Zellklone durch Verwendung von Klonierungsringen abgelöst, weiterkultiviert und untersucht werden (vgl. Kap. IV. 2.4.1.). Wie in Abb. V.6. dargestellt entstanden auf diese Weise verschiedene Klone mit sehr unterschiedlicher Expression. So zeigt zum Beispiel der Klon #4 eine sehr schwache G-Expression mit wenigen sehr stark exprimierenden Zellen und wird deshalb nicht für die folgenden Versuche verwendet. Klon #6 hingegen weist ein mittleres Expressionslevel mit einigen stark exprimierenden Zellen auf. Eine optimale Expression zeigt der Klon #5. Er weist eine ca. 100 %ige Expression mit einem heterogenen Expressionsmuster auf und wird deshalb für die folgenden Versuche verwendet. Alle drei Klone wurden für die dauerhafte Lagerung in flüssigem Stickstoff eingefroren.

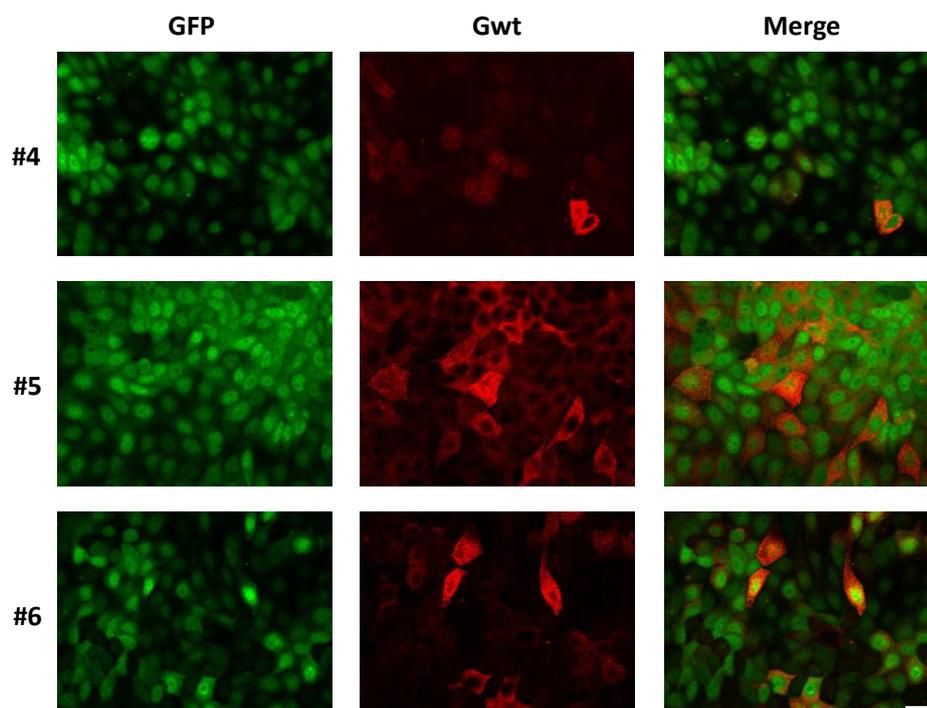


Abb. V.6.: Untersuchung der Oberflächenexpression der durch Transduktion hergestellten stabil G_{wt} exprimierenden MDCK-Klone #4, #5 und #6. Die durch Transduktion hergestellten stabil G_{wt}

exprimierenden MDCK-Zellen wurden auf *chamber slides* ausgesät und nach 24 h unfixiert mit einem polyklonalen NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3) und mit einem Rhodamin-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Axiovert 200M ApoTome Fa. Zeiss, Vergrößerung: x630, Balken: 20 μm

2.4. Verteilung von NiV F und G in stabil exprimierenden MDCK-Zellen

Zur Untersuchung der Verteilung der NiV F- und G-Proteine wurde eine Immunfluoreszenzanalyse der stabil exprimierenden MDCK-Zellen durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen wie in Kap. IV. 2.2. auf Transwell-Filtern ausgesät und kultiviert. Nach sieben Tagen Wachstum wurden die Zellen wie in Kap. IV. 3.2.3. beschrieben unfixiert von der basalen und apikalen Seite mit einem polyklonalen NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3) und einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Die Auswertung erfolgte mittels des konfokalen Laserscanningmikroskops Axioplan 2 LSM 510 der Fa. Zeiss. Dabei wurden die Zellen von der apikalen und basalen Seite (konfokale horizontale Schnitte parallel zum Filter), sowie in einem senkrechten Schnitt durch den Zellrasen (z-scan, in der Abbildung jeweils unten rechts eingefügt) betrachtet.

Wie in Abb. V.7. zu sehen, kann sowohl bei F- (A), als auch bei G- (B) stabil exprimierenden MDCK-Zellen eine starke Fluoreszenz vor allem im lateralen Bereich der polarisierten Zellen detektiert werden, was sich in der Draufsicht durch ein typisches Wabenmuster darstellt. Es ist darüberhinaus ebenfalls eine Fluoreszenz im basalen Bereich der Zellen (F: 10,04 μm und G: 9,17 μm und 9,49 μm) nachweisbar. Es lässt sich also schlussfolgern, dass sowohl NiV F als auch G in polarisierten MDCK-Zellen hauptsächlich basolateral exprimiert werden.

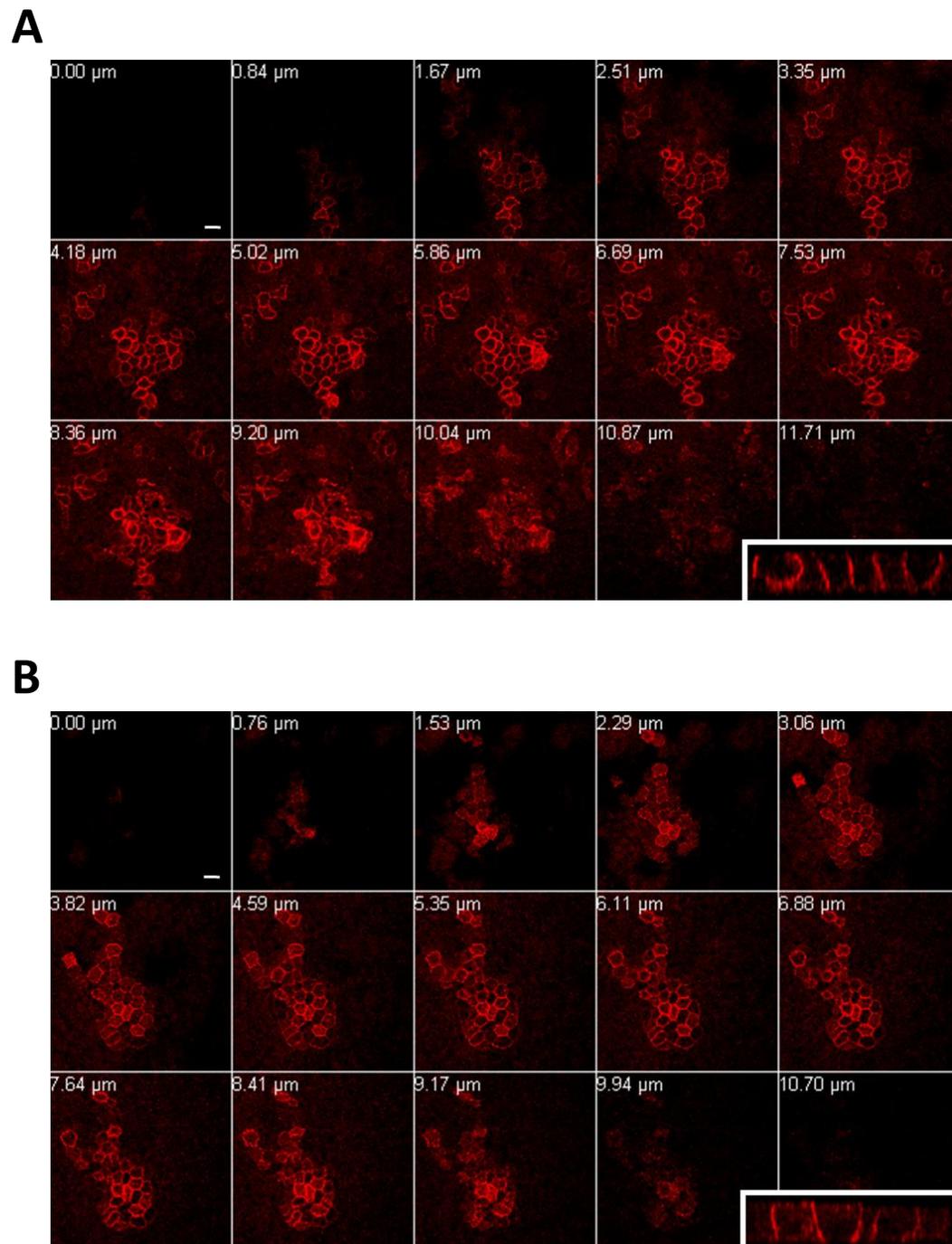


Abb. V.7.: Oberflächenverteilung der wildtypischen NiV-Glykoproteine in polarisierten MDCK-Zellen. 7 Tage nach Aussäen der stabil F- (A) oder G- (B) exprimierenden MDCK-Zellen auf Transwell-Filtern wurden die Zellen unfixiert mit einem polyklonalen NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3, 1:500) und mit einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Konfokale horizontale Schnitte von apikal (oben links) nach basal (unten rechts), sowie ein vertikaler Schnitt durch die Zellen ist jeweils unten rechts gezeigt. Axioplan 2 LSM510 Fa. Zeiss, Vergrößerung: x630, Balken: 20 μm .

2.5. Einfluss der Mutation in potentiellen Sortierungssignalen auf die basolaterale Verteilung der NiV-Glykoproteine in polarisierten MDCK-Zellen

Im Folgenden sollte die basolaterale Verteilung der NiV-Glykoproteine näher untersucht werden. Es ist bekannt, dass die Information für den basolateralen Transport meistens in der zytoplasmatischen Domäne von Transmembranproteinen in Form kleiner Peptidmotive kodiert ist. Diese werden durch zytosolische Adaptorproteine(AP)-Komplexe⁽¹¹⁾ erkannt und sind für einen gerichteten Transport verantwortlich sind. Man unterscheidet hierbei Tyrosin-abhängige Motive mit der Konsensus-Sequenz YXXØ (Y ist ein Tyrosin, X kann jede beliebige Aminosäure sein, Ø ist eine hydrophobe Aminosäure) und Leucin-abhängige Motive. Die zytoplasmatische Domäne des F-Proteins, die 28 Aminosäuren umfasst, besitzt drei Tyrosine (vgl. Abb. V.6.). Eines an der Position 525 (Y₅₂₅) in einem klassischen YXXØ-Motiv und ein Di-Tyrosinmotiv an der Position 542 und 543 (Y_{542/543}). Wie in vorherigen Arbeiten gezeigt wurde, ist das Tyrosin an der Position 525 für die Clathrin-vermittelte Endozytose und somit für die proteolytische Aktivierung des F-Protein durch endosomale Cathepsine verantwortlich^(35, 36, 117, 151). Ebenso wie das F-Protein besitzt die 45 Aminosäuren umfassende zytoplasmatische Domäne des G-Proteins ein Di-Tyrosinmotiv (Y_{28/29}) sowie ein Di-Leucinmotiv (L_{41/42}) (vgl. Abb. V.8.). Für beide Motive konnte in früheren Studien kein Effekt auf die G-Endozytose oder die Helferfunktion des G-Proteins bei der Fusion gezeigt werden.⁽¹⁵¹⁾

Um den Einfluss dieser potentiellen Motive für den basolateralen Transport zu untersuchen, wurde die Oberflächenverteilung von F- und G-Protein deren Tyrosine oder Leucine durch Alanine ausgetauscht wurden, in stabil exprimierenden MDCK-Zellen analysiert (siehe Abb. V.8.). Hierfür wurde bei den F-Mutanten auf bereits vorhandene stabil exprimierende MDCK-Zellen zurückgegriffen (F_{Y525A}, F_{Y542/543A}, F_{YA},^(150, 151)). Die MDCK-Zellen, die die G-Mutanten exprimieren (G_{Y28/29}, G_{Y28A}, G_{Y29A}, G_{L41/42}), wurden entweder durch Lipofektion (vgl. IV. 2.4.1.) oder durch Transduktion mit Pseudotypen (vgl. IV. 2.4.2.) hergestellt. So wurden für G_{Y28/29A}, G_{Y28A}, G_{Y29A} und G_{L41/42A} jeweils drei Klone durch Lipofektion erzeugt (Klon #1 bis #3).

Darüberhinaus wurden von G_{Y28/29A} und G_{L41/42A} stabil exprimierende MDCK-Zellen durch Transduktion mit Pseudotypen hergestellt (Klon #4 bis #6). Für die weiteren Versuche wurden Klone verwendet, die eine optimale Expression (100 % positiv, heterogene Expression) aufweisen. Es wurden folgende Klone verwendet (G_{Y28/29A} #6, G_{L41/42A} #5, G_{Y28A} #1, G_{Y29A} #2).

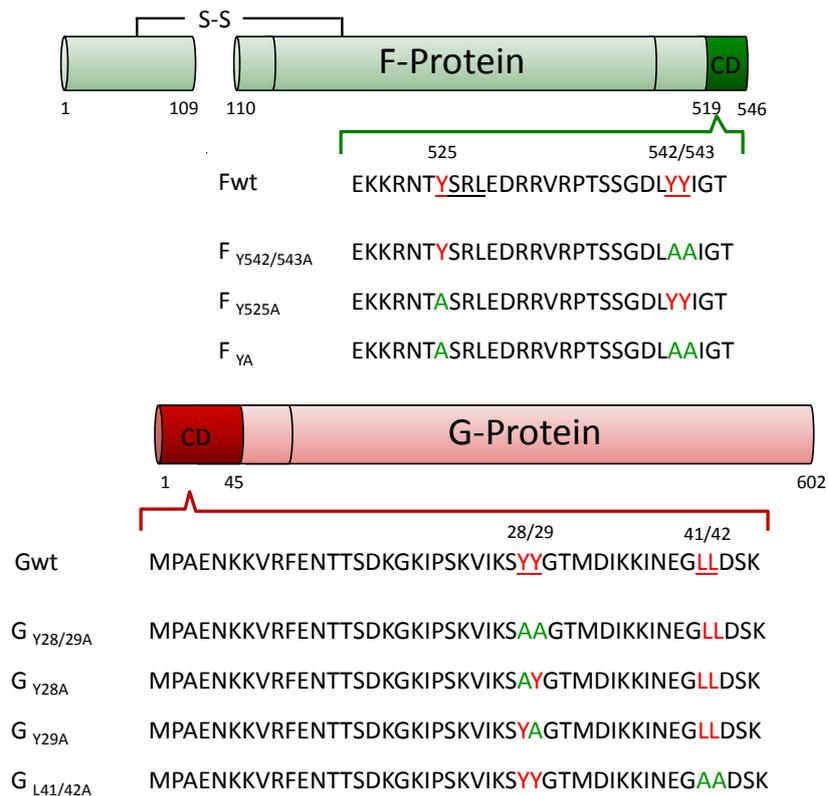


Abb. V.8.: Schematische Darstellung und Sequenzen der zytoplasmatischen Domänen des NiV F- und G-Proteins und der verschiedenen Mutanten. Die Aminosäuren sind im Einbuchstabencode angegeben. Die Nummern geben die Aminosäureposition an. Unterstrichen und in rot dargestellt sind die vermuteten Transportsignale und in grün deren Punktmutationen dargestellt.

2.5.1. Verteilung der mutierten NiV-Glykoproteine auf der Oberfläche polarisierter MDCK-Zellen

Um zu untersuchen, ob die Mutation der potentiellen Motive einen Einfluss auf den basolateralen Transport hat, wurden die stabil exprimierenden MDCK-Zellen auf Transwell-Filtern ausgesät und sieben Tage bis zum Ausbilden einer vollständigen

Polarität kultiviert. Im Anschluss wurde eine Immunfluoreszenzanalyse der Oberflächenglykoproteine durchgeführt (vgl. Kap IV. 3.2.3.). Hierbei wurden die unfixierten Zellen von der apikalen und basalen Seite mit einem NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3) und einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper behandelt. Untersucht wurden die Präparate mithilfe des konfokalen *Laser Scanning* Mikroskops Axioplan 2 LSM510 der Fa. Zeiss.

Wie in den Senkrechtschnitten (xz) in Abb. V.9.A zu sehen, führt die Mutation des Di-Tyrosinmotivs an Position 542/543 in polarisierten MDCK-Zellen verglichen mit dem wildtypischen F-Protein (F_{wt}) zu keiner veränderten Oberflächenverteilung des F-Proteins. $F_{Y542/543A}$ wird also ebenfalls basolateral exprimiert. Im Gegensatz dazu ist das F-Protein mit dem mutierten YXXØ-Motiv (F_{Y525A}) vollständig auf der apikalen Membrandomäne nachweisbar. Die Doppelmutante F_{YA} , die beide Mutationen enthält, verhält sich erwartungsgemäß wie die Mutante F_{Y525A} und ist rein apikal nachzuweisen. Hier konnten frühere Daten bestätigt werden⁽¹⁵¹⁾ und es lässt sich also schlussfolgern, dass nur das Tyrosin an der Position 525 eine wichtige Rolle bei der basolateralen Verteilung des NiV F spielt.

Die basolaterale Verteilung des G-Proteins ist wie in Abb. V.9.B zu sehen durch die Mutation des Di-Leuzinmotivs ($G_{L42/43A}$) im Vergleich zum wildtypischen G-Protein nicht gestört. Hingegen wird das G-Protein mit dem mutierten Di-Tyrosinmotiv ($G_{Y28/29A}$) rein apikal detektiert. Um zu untersuchen, ob beide Tyrosine oder nur jeweils ein einzelnes für diese Umverteilung verantwortlich ist, wurden stabil exprimierende MDCK-Zellen hergestellt, bei denen jeweils nur ein Tyrosin durch ein Alanin ausgetauscht wurde (vgl. Abb. V.9.B). Sowohl die Mutante G_{Y28A} als auch G_{Y29A} zeigen eine rein apikale Verteilung. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass beide Tyrosine an der Position 28 und 29 notwendig für die basolaterale Verteilung des NiV-G sind.

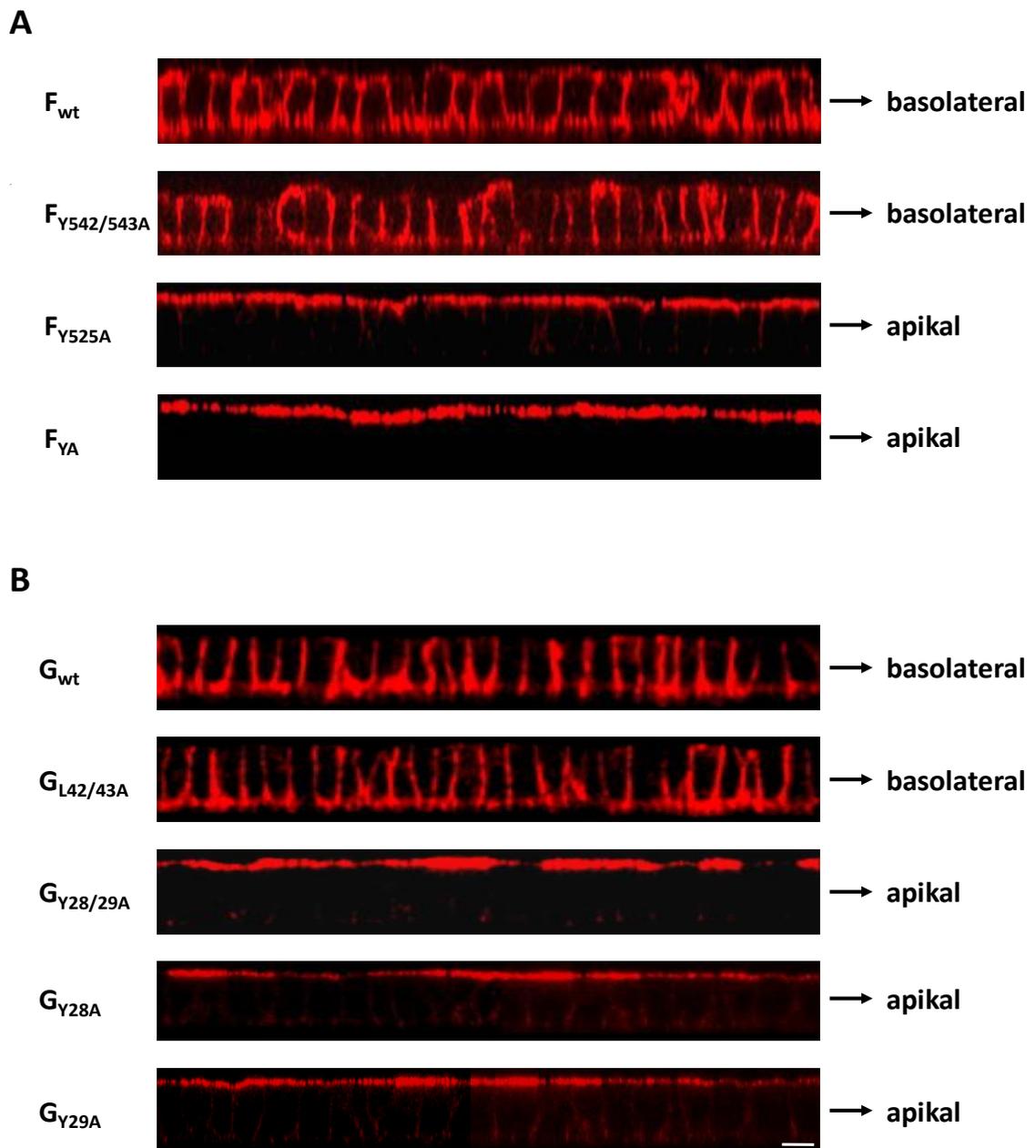


Abb. V.9.: Oberflächenverteilung der NiV F- und G-Proteine mit Mutationen in den potentiellen Signalen innerhalb der zytoplasmatischen Anteile. MDCK-Zellen, die entweder das wildtypische oder das mutierte NiV F (A) oder G (B) stabil exprimieren wurden auf Transwell-Filtern ausgesät und nach 7 Tagen von der basalen und apikalen Seite mit einem polyklonalen NiV-spezifischen Meerschweinchen-serum (gp3, 1:500) und mit einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Konfokale vertikale Schnitte durch die Zellen (z-scan) sind gezeigt. Axioplan 2 LSM510 Fa. Zeiss, Vergrößerung: x630, Balken: 10 μ m

2.5.2. Fusionsaktivität der wildtypischen und mutierten NiV-Glykoproteine in polarisierten und unpolarisierten MDCK-Zellen

In den folgenden Versuchen sollte analysiert werden, ob die apikale Umverteilung der NiV-Glykoproteine eine biologische Bedeutung hat. Um die Frage zu klären, ob eine Zell-Zell-Fusion in polarisierten MDCK-Zellen verhindert wird, wenn die Proteine statt zur basolateralen zur apikalen Membrandomäne transportiert werden, wurden die wildtypischen oder mutierten NiV F und G koexprimiert. Da das apikal umverteilte F_{Y525A} endozytosedefizient ist, somit nicht gespalten wird und damit fusionsinaktiv ist, konnte dieses nicht für Koexpressionsstudien verwendet werden. Deshalb wurden für die folgenden Versuche stabil wildtypisches F-Protein exprimierende MDCK-Zellen verwendet, die entweder mit dem basolateral lokalisierten G (G_{wt} und G_{L41/42A}) bzw. dem apikal umverteilten G_{Y28/29A} transfiziert wurden. Der verwendete F_{wt}-Klon wies 100 % positive Zellen auf, was eine gleichzeitige Expression des stabilen F_{wt} und des transient transfizierten G_{wt} bzw. G_{Y28/29A} und G_{L41/42A} gewährleistet.

Für die Untersuchung der Fusion in unpolarisierten Zellen wurden MDCK-Zellen subkonfluent auf Deckgläschen ausgesät und mit den Plasmiden, die für G_{wt}, G_{Y28/29A} bzw. G_{L41/42A} kodieren, transfiziert (vgl. Kap. II. 2.3.1.). Zur Untersuchung der Fusion in polarisierten MDCK-Zellen wurden auf Filtern polarisiert gewachsene MDCK-Zellen mit G_{wt}, G_{Y28/29A} bzw. G_{L41/42A} transfiziert (vgl. Kap. II. 2.3.2.). 24 h (unpolarisierte Zellen) bzw. 48 h (polarisierte Zellen) nach Transfektion wurden die Zellen unfixiert mit einem G-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb26) und einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Zur Darstellung der Zell-Zell-Verbindungen wurde in polarisierten Zellen das *adherens junction*-Protein E-Cadherin mittels eines monoklonalen Antikörpers und eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen. Ausgewertet wurden die Präparate mit dem konfokalen *Laser Scanning* Mikroskops SP5 der Fa. Leica.

Wie in Abb. V.10.A zu sehen, induzieren alle G-Proteine (G_{wt}, G_{L41/42A} und G_{Y28/29A}) in unpolarisierten MDCK-Zellen die Bildung von großen Synzytien. Das bedeutet, dass alle G-Proteine biologisch aktiv sind und dass die zytoplasmatischen Mutationen keine generell negative Auswirkung auf Fusionsunterstützung haben.

Im Gegensatz dazu ist in polarisierten MDCK-Zellen (Abb. V.10.B) Zell-Zell-Fusion nur dann nachweisbar, wenn die Zellen mit den Plasmiden transfiziert wurden, die für basolateral exprimierte G-Proteine kodieren ($F_{wt} + G_{wt}$ und $F_{wt} + G_{L41/42A}$). In polarisierten MDCK-Zellen, die mit dem apikal exprimierten $G_{Y28/29A}$ transfiziert wurden, sind lediglich einzelne G-positive Zellen nachweisbar.

Dies bestätigt das Modell, dass beide fusogenen Glykoproteine auf der basolateralen Zelloberfläche exprimiert werden müssen, damit eine Zell-Zell-Fusion stattfinden kann, während die apikale Expression auch nur eines der Glykoproteine (hier des G-Proteins) die Bildung von Synzytien verhindert. Somit kann für die NiV-Glykoproteine geschlussfolgert werden, dass die Mutation der basolateralen Sortierungssignale, die eine apikale Umverteilung des G-Proteins zur Folge hat, die Zell-Zell-Fusion in polarisierten Zellen verhindert.

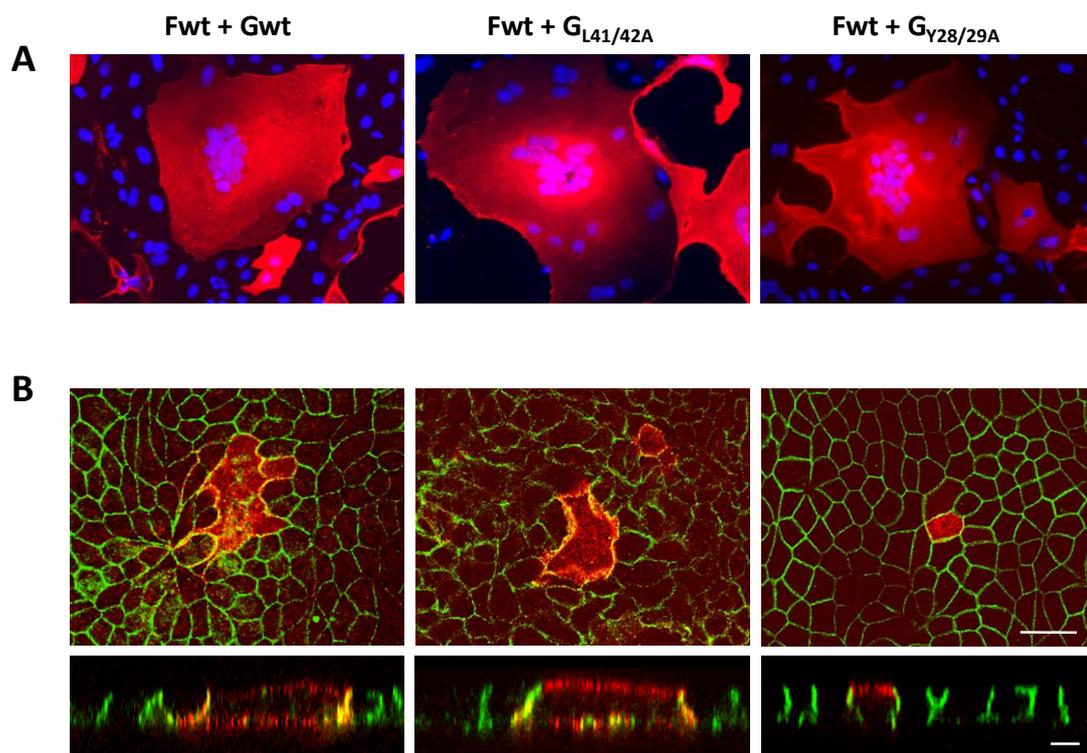


Abb. V.10.: Fusionsaktivität und Oberflächenverteilung von wildtypischen und mutierten G-Proteinen bei Koexpression mit stabil exprimiertem F_{wt} . (A) Synzytienbildung in unipolarisierten MDCK-Zellen. MDCK-Zellen, die das wildtypische F-Protein stabil exprimieren, wurden mit den Plasmiden für das wildtypische ($F_{wt} + G_{wt}$) und die mutierten G-Proteine ($F_{wt} + G_{L41/42A}$ und $F_{wt} + G_{Y28/29A}$) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen ohne Fixierung und Permeabilisierung von der apikalen und

basalen Seite mit einem G-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb26, 1:250) und einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundäntikörper inkubiert. Die Zellkerne wurden durch eine DAPI-Färbung sichtbar gemacht. Axiovert 200M ApoTome Fa. Zeiss, Vergrößerung: x200. (B) Synzytienbildung in polarisierten MDCK-Zellen. Stabil F_{wt} -exprimierende MDCK-Zellen wurden nach 5 Tagen Wachstum auf Transwell-Filtern mit Plasmiden, die für wildtypisches und mutierte G kodieren, transfiziert. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen unfixiert und unpermeabilisiert von der basalen und apikalen Seite mit einem G-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb26, 1:250) und einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundäntikörper inkubiert. Nach Permeabilisieren und Fixieren mit Methanol/Aceton wurden die Zell-Zell-Verbindungen mittels eines spezifischen Antikörpers gegen E-Cadherin und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundäntikörper dargestellt. Konfokale horizontale (oben) und vertikale (unten) Schnitte sind gezeigt. Leica SP5 Fa. Leica, Vergrößerung: x630, Balken: 10 μ m

Wie in den vertikalen Schnitten durch Synzytien im unteren Teil von Abb. V.10.B zu sehen, werden die in der stabilen Einzeldominanz basolateral lokalisierten Mutanten $G_{L41/42A}$ und $G_{Y28/29A}$ nun auch apikal exprimiert. Dies könnte einerseits an einem gewissen Polaritätsverlust der transfizierten Zellen liegen, aber auch an einer Proteinumverteilung in F- und G-koexprimierenden Zellen. Um zu untersuchen, ob das F-Protein in Koexpression mit G_{wt} ebenfalls umverteilt wird, wurden polarisierte stabil F-Protein exprimierende MDCK-Zellen mit G_{wt} transfiziert und 48 h p.t. beide Glykoproteine mit spezifischen monoklonalen Antikörpern (mAb92 bzw. mAb26, 1:250) und einem Alexa Fluor 568- bzw. 488-gekoppelten Sekundäntikörper inkubiert. Wie in Abb. V.11.A. zu sehen, liegen beide Proteine im Synzytium sowohl basolateral als auch apikal vor und koloalisieren miteinander. Diese Verteilung ähnelt sehr der F- und G-Lokalisation in infizierten MDCK-Zellen (vgl. Abb. V.3.) Dies lässt vermuten, dass für die bipolare Umverteilung nach Zell-Zell-Fusion keine anderen viralen Proteine, wie z.B. das Matrixprotein, verantwortlich zu sein scheinen. Vielmehr deuten die Ergebnisse darauf hin, dass die Zerstörung der Epithelzellen und der damit einhergehende Polaritätsverlust zu einer Fehlverteilung zur apikalen Membran führt. Es ist anzunehmen, dass die laterale Expression der Glykoproteine in infizierten Zellen nur ganz früh in der Infektion vorübergehend an den Kontaktstellen zu nicht-infizierten Zellen zu finden ist. Sobald es zur Fusion kommt und die Zellen zum Bestandteil eines Synzytiums werden, geht die Polarität der Zellen und damit die gerichtete basolaterale Sortierung verloren.

Um zu untersuchen, ob die Glykoproteine gegenseitig ihre Verteilung in polarisierten Epithelzellen beeinflussen können, wurden polarisierte, G_{wt} -exprimierende MDCK-Zellen mit der apikal exprimierten, nicht fusogenen Mutante F_{Y525A} transfiziert. 48 h p.t. wurden die Zellen von beiden Seite mit einem spezifischen Antikörper gegen das G- oder F-Protein (mAb26 bzw. mAb92) und einem Alexa Fluor 568- bzw. Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Wie in Abb. V.11.B. zu sehen, ist in Zellen, die nur G_{wt} exprimieren, dieses erwartungsgemäß basolateral nachweisbar. In Zellen allerdings, die F_{Y525A} koexprimieren, wird G_{wt} zur apikalen Membrandomäne umverteilt.

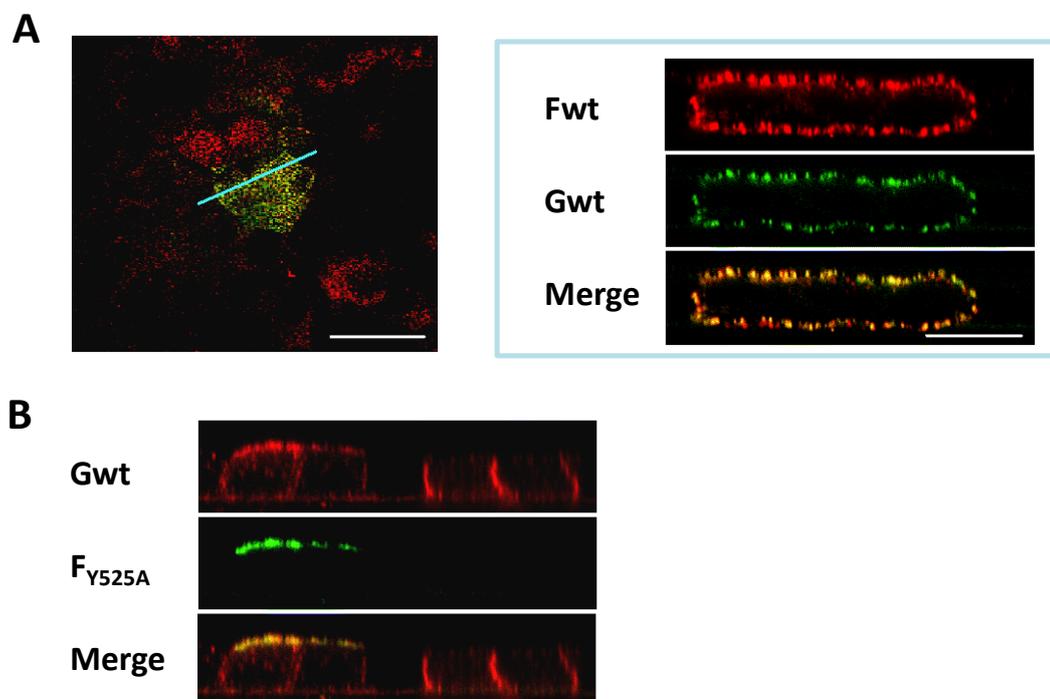


Abb. V.11.: Verteilung der NiV-Proteine in polarisierten MDCK-Zellen bei Koexpression von wildtypischen G-Proteinen mit F_{wt} und F_{Y525A} . (A) Stabil F_{wt} -exprimierende MDCK-Zellen wurden nach 5 Tagen polarisiertem Wachstum auf Transwell-Filtern mit dem Plasmid kodierend für G_{wt} transfiziert. 48 h nach Transfektion wurde das stabil-exprimierte F_{wt} auf der Zelloberfläche mit einem spezifischen monoklonalen Antikörper gegen das F-Protein (mAb92, 1:250) und einem Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper sichtbar gemacht. Das transient exprimierte G_{wt} wurde mit einem G-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb26, 1:250) und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Es ist ein konfokaler Schnitt horizontal durch den apikalen Teil eines Synzytiums (links) und vertikale Schnitte durch die Zellen entsprechend der Linie im linken Bild gezeigt (rechts). (B) Verteilung des wildtypischen G-Proteins bei Koexpression mit F_{Y525A} . Polarisierte G_{wt} stabil exprimierende MDCK-Zellen wurden mit dem Plasmid kodierend für F_{Y525A} transfiziert. 48 h p.i. wurde das stabil exprimierte G_{wt}

mittels eines spezifischen monoklonalen Antikörpers (mAb26, 1:250) und eines Alexa Fluor 568-gekoppelten Sekundärantikörper detektiert. Das transient exprimierte F_{Y525A} wurde mit einem F-spezifischen monoklonalen Antikörper (mAb92, 1:250) und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Gezeigt sind konfokale vertikale Schnitte durch die Zellen. Leica SP5 Fa. Leica, Vergrößerung: x630, Balken: 10 µm.

3. Rolle der Adaptorprotein(AP)-Komplexe beim basolateralen Transport der NiV-Glykoproteine in MDCK-Zellen

Es ist bekannt, dass in der Zelle verschiedene zelluläre Proteine für den gerichteten Transport von Transmembranproteinen verantwortlich sind. Zu diesen gehören auch die AP-Komplexe, von denen man vier Gruppen unterscheidet: AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4. Vor kurzer Zeit wurde ein fünfter AP-Komplex (AP-5) identifiziert, der jedoch zum Zeitpunkt der Untersuchungen noch nicht bekannt war und deshalb nicht analysiert werden konnte.

AP-1 ist für den Transport vom *trans Golgi network* (TGN) zu den Kompartimenten des endosomalen/lysosomalen Systems verantwortlich. Die Variante AP-1B ist im Speziellen in polarisierten Epithelzellen für den Transport zur basolateralen Membrandomäne zuständig. AP-2 spielt bei der Clathrin-vermittelten Endozytose in das frühe Endosomen eine entscheidende Rolle. AP-3 ist in den Transport vom TGN über das frühe und späte Endosom zu den lysosomalen Organellen involviert. Ebenfalls für den basolateralen Transport zuständig ist das AP-4. Im Gegensatz zu AP-1B geschieht der Transport jedoch auf einem direkten Weg vom TGN zu der basolateralen Membrandomäne von polarisierten Epithelzellen. Alle Adaptorproteine haben gemeinsam, dass sie über die sogenannte µ-Untereinheit verfügen die YXXØ-Signalsequenzen ihrer Kargoproteine erkennen und binden (vgl. Abb. II.7.). AP-1, AP-2 und AP-3 sind zudem noch in der Lage ebenfalls über die µ-Untereinheit bzw. und/oder die β-Untereinheit mit Signalsequenzen des Konsensusmotivs [DE]XXXL[LI] zu interagieren.

Da diese zellulären Proteine eine entscheidende Rolle beim Transport von Proteinen in polarisierten Zellen spielen und die zytoplasmatischen Domänen der NiV-Glykoproteine potentielle Konsensusmotive besitzen, sollte im Folgenden

untersucht werden, ob die Adaptorproteine für die gerichtete Verteilung verantwortlich sein könnten.

3.1. Untersuchung endogenen Adaptorprotein(AP)-Komplexe in MDCK-Zellen durch Immunfluoreszenzanalyse

Um zu untersuchen, ob die AP-Komplexe in MDCK-Zellen für den Transport der NiV-Glykoproteine verantwortlich sein könnten, sollten Koimmunfluoreszenzanalysen der wildtypischen F- und G-Proteine mit den in MDCK-Zellen endogen exprimierten AP durchgeführt werden. Hierfür wurden kommerziell erhältliche Antikörper (AP-1 Lifespan Biosciences; AP-2, AP-3 und AP-4 Santa Cruz Biotechnology) gerichtet gegen einzelne Untereinheiten der AP (AP-1: σ , AP-2: μ , AP-3A: μ , AP-4: σ) verwendet. Zum Etablieren eines optimalen Färbeprotokolls wurden MDCK-Zellen subkonfluent auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag wie in Kap. IV. 3.2.4. beschrieben mit Methanol/Aceton (1:1) bzw. 2 % PFA/0,2 % Triton X100 fixiert und permeabilisiert. Zum Austesten der optimalen Antikörperkonzentration wurden Verdünnungen von 1:10, 1:50, 1:100, 1:250 und 1:300 hergestellt und die Zellen damit inkubiert. Zum Detektieren der Primärantikörper wurden die MDCK-Zellen mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Ausgewertet wurden die Präparate am Fluoreszenzmikroskop Axiovert 200M der Fa. Zeiss.

Leider konnte in keinem Versuchsansatz eine spezifische Fluoreszenz für die AP nachgewiesen werden (nicht gezeigt). Daraus muss man also schlussfolgern, dass es nicht möglich ist mit den zur Verfügung stehenden kommerziell erhältlichen Antikörpern die endogenen AP-Komplexe in MDCK-Zellen nachzuweisen. Dies kann zum einen daran liegen, dass die AP in MDCK-Zellen in einem zu geringen Maße exprimiert werden. Zum anderen kann es aber auch daran liegen, dass die Antikörper, die zur Erkennung humaner AP-Untereinheiten generiert wurden, keine AP-Komplexe in der vom Hund abstammenden Epithelzelllinie MDCK detektieren können.

3.2. Interaktion transient exprimierter μ -Untereinheiten der AP-Komplexe mit wildtypischen NiV-Glykoproteinen durch Koimmunfluoreszenzanalyse

Da endogenen AP in MDCK-Zellen nicht detektiert werden konnten, sollte versucht werden die μ -Untereinheiten der AP-Komplexe zusammen mit den NiV Glykoproteinen in MDCK-Zellen transient zu exprimieren, um Koimmunfluoreszenzanalysen durchzuführen. Hierfür wurden uns von J.S. Bonifacino pACT2-Plasmide zur Verfügung gestellt, die die μ -Untereinheiten von AP-1A (*mouse*), AP-1B (*human*), AP-2 (*mouse*), AP-3A (*rat*) und AP-4 (*human*) kodieren. Da es sich hierbei um Expressionsplasmide handelt, die für Interaktionsstudien im *yeast two hybrid*(Y2H)-Assay eingesetzt werden, mussten die μ -Untereinheiten zuerst in das für Säugerzellen geeignete Expressionsplasmid pCG kloniert werden. Hierfür wurden den μ -Untereinheiten mittels PCR neue Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (Tab. V.1.) am 3'- und 5'-Ende, sowie ein Flag-Tag am 5'-Ende angefügt (vgl. Kap. IV. 1.1.). Das Flag-Tag dient der Detektion der Proteine durch kommerziell erhältliche anti-Flag Antikörper. Nach erfolgreicher Amplifikation der μ -Untereinheiten mittels PCR wurden das Plasmid pCG und das PCR-Produkt mit den entsprechenden Restriktionsendonukleasen verdaut (vgl. Kap. IV. 1.4.), der Vektor mit alkalischer Phosphatase behandelt (vgl. Kap. IV. 1.5.) und eine Ligation durchgeführt (vgl. Kap. IV. 1.6.). Danach wurden die ligierten Plasmide durch Hitzeschock in chemisch kompetente Bakterien transformiert (vgl. Kap. IV. 1.7.) und auf einer Ampicillin-haltigen Agarplatte ausgestrichen. Bakterien, die die Plasmide aufgenommen hatten, waren am nächsten Tag als Kolonien sichtbar. Jeweils sechs Kolonien wurden in 2 ml Ampicillin-haltiges Medium überführt und über Nacht bei 37 °C schüttelnd inkubiert. Am folgenden Tag wurde die DNA aus den Bakterien präpariert (vgl. Kap. IV. 1.8.) und durch Testverdau (vgl. Kap. IV. 1.4.) mit Restriktionsendonukleasen (Tab. V.1.) und elektrophoretische Auftrennung im Agarosegel (vgl. Kap. IV. 1.3.) analysiert. Positive Klone, also Bakterien, die die DNA aufgenommen hatten, zeigten hierbei die in Tab. V.1. aufgeführten Laufhöhen der einzelnen Fragmente (Abb. V. 12.). Jeweils ein Klon (AP-1A: #4, AP-1B: #1, AP-2: #2,

AP-3A: #2, AP-4: #3) wurde durch Sequenzierung (Seqlab, Göttingen) auf die Richtigkeit der Sequenz untersucht.

pCG μ	Eingefügte Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen		Testverdau	
	3'	5'	verwendete Restriktionsendonukleasen	Laufhöhe der Fragmente
AP-1A	BamHI	XbaI	BamHI, XbaI	~1300 bp ~4500 bp
AP-1B	XbaI	XbaI	BamHI, XhoI	~600 bp ~1200 bp ~4000 bp
AP-2	XbaI	XbaI	BamHI, XhoI	~850 bp ~1000 bp ~4000 bp
AP-3A	BamHI	PstI	BamHI, PstI	~1300 bp ~4500 bp
AP-4	XbaI	XbaI	BamHI, XhoI	~400 bp ~630 bp ~850 bp ~4000 bp

Tab. V.1.: Übersicht über die eingefügten Schnittstellen, die für den Testverdau verwendeten Restriktionsendonukleasen und die erwarteten Fragmente nach dem Testverdau.

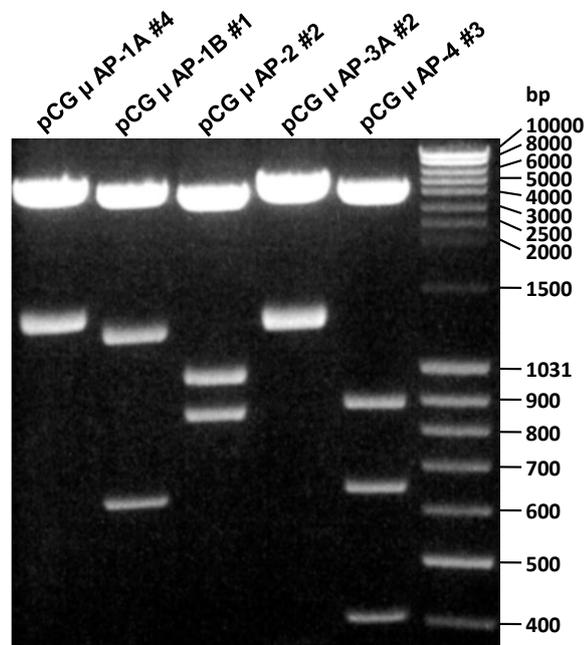


Abb. V.12.: Agarosegel des Testverdau der ausgewählten Klone der μ -Untereinheiten in pCG.

Nach Gewinnung größerer DNA-Mengen durch Maxi-Präparation (vgl. Kap. IV. 1.8.) konnte die DNA zur Transfektion von MDCK-Zellen eingesetzt werden. Hierfür wurden MDCK-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag durch Lipofektion (vgl. Kap. IV. 2.3.) transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Methanol/Aceton (1:1) permeabilisiert und fixiert und mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Flag-Tag und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert.

Wie in Abb. V.13.A zu sehen, werden die μ -Untereinheiten der AP-Komplexe in MDCK-Zellen exprimiert, jedoch lässt sich feststellen, dass die Zellen nach 24 stündiger Expression in einem sehr schlechten Zustand sind. Die Überexpression der μ -Untereinheiten scheint für die Zellen toxisch zu sein. Wahrscheinlich führt die deutlich höhere, transiente Expression dieser zellulären Proteine verglichen mit der durch die Zelle regulierten endogenen Expression der AP zu einer Überlastung der Proteintransportmaschinerie.

Um diese Problematik zu umgehen, wurden die transfizierten MDCK-Zellen nun zu einem früheren Zeitpunkt nach Transfektion gefärbt (14 h p.t.). Wie in Abb. V.13.B zu sehen, ist die AP-Expression zu diesem Zeitpunkt deutlich schwächer, also keine so starke Überexpression zu sehen. Die eher diffuse bis flächige Verteilung der AP-Komplexe entspricht aber keiner der in der Literatur beschriebenen AP-Verteilung. Hier sind die AP meist als distinkte Vesikel im perinukleären Bereich der Zellen zu sehen.^(22, 33, 116, 122, 137) Versuche, eine akzeptable, nicht-toxische Expression durch Verringern der DNA-Menge von 1 μ g auf bis zu 250 ng zu erreichen, brachten keine Verringerung der Überexpression und damit keine Verbesserung der Verteilung der AP. Es konnten lediglich weniger positive Zellen detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

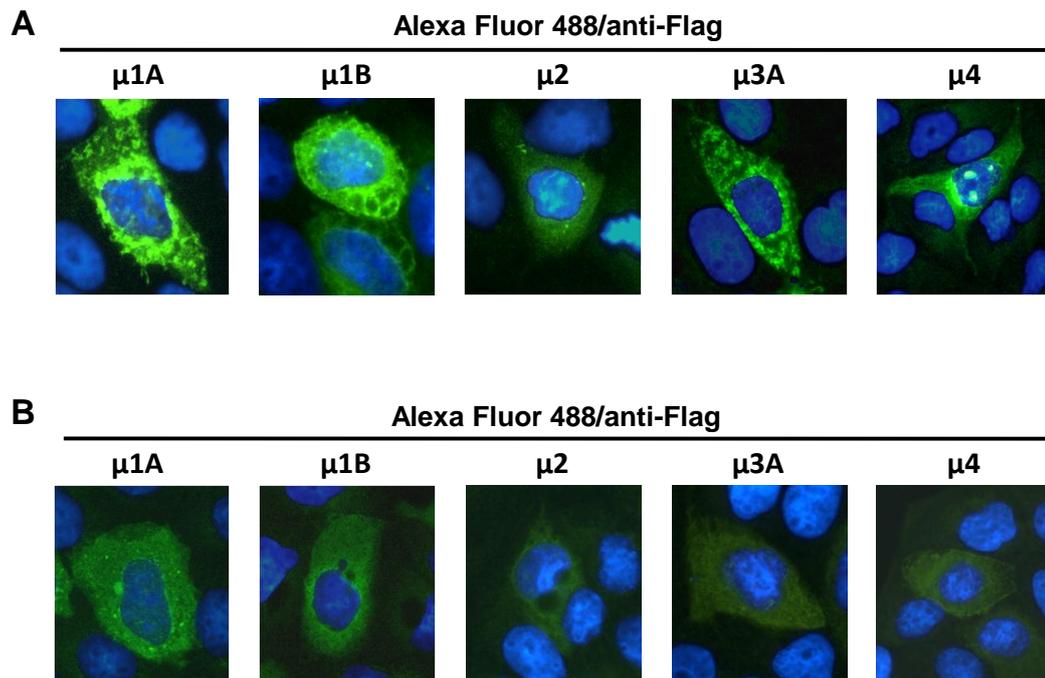


Abb. V.13.: Verteilung der transient transfizierten μ -Untereinheiten der AP-Komplexe in MDCK-Zellen. MDCK-Zellen wurden subkonfluent auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag durch Lipofektion mit den für die μ -Untereinheiten der AP kodierenden Plasmiden transfiziert. (A) 24 h oder (B) 14 h nach Transfektion wurden die Zellen mit Methanol/Aceton (1:1) permeabilisiert und fixiert und anschließend mit einem monoklonalen anti-Flag-Antikörper (Sigma Aldrich, 1:400) und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Axioplan, Fa. Zeiss, Vergrößerung: 1000x

3.3. Untersuchung der Interaktion stabil exprimierter μ -Untereinheiten der AP-Komplexe mit den wildtypischen NiV-Glykoproteinen durch Koimmunfluoreszenzanalyse

Um die Probleme, welche die Überexpression der μ -Untereinheiten in MDCK-Zellen mit sich führt, zu umgehen, sollten MDCK-Zellen hergestellt werden, die die μ -Untereinheiten der AP stabil exprimieren. Wie in Kap. IV. 2.4.1. beschrieben, wurden dazu MDCK-Zellen in die Vertiefungen von 6-Well-Platten ausgesät und am nächsten Tag mit den Plasmiden, die für die μ -Untereinheiten kodieren durch Lipofektion transfiziert. Da das pCG-Plasmid für keine Resistenz kodiert, wurde das Resistenzplasmid pIG im Verhältnis 1:10 dem Transfektionsansatz zugefügt. Dieses Plasmid kodiert für eine Genetizin(Neomycin)- Resistenz und erlaubt somit das

Selektionieren transfizierter Zellen. 24 h nach Transfektion wurden die Zellen vom Boden der Vertiefungen unter Verwendung von Trypsin abgelöst und in eine 10 cm-Schale expandiert. Am nächsten Tag wurde mit der Selektion positiver Zellen durch Zugabe von Genetizin (1,5 mg/ml) begonnen. Das Medium wurde in den folgenden zwei bis drei Wochen alle zwei bis drei Tage erneuert. Nach ca. zwei Wochen waren die ersten, deutlich mit dem bloßen Auge sichtbaren Zellkolonien zu erkennen. Sobald die Zellklone einen Durchmesser von ca. 3-8 mm aufwiesen, wurden diese durch Verwenden von Klonierungsringen vom Boden der 10 cm-Schale abgelöst und in die Vertiefungen von 24-Well-Platten überführt. Nachdem die MDCK-Zellen in diesen Vertiefungen zu einem konfluenten Zellrasen gewachsen waren, wurden sie unter Verwendung von Trypsin abgelöst und in die Vertiefungen von 6-Well-Platten, denen ein Deckgläschen beigefügt wurde, überführt. Sobald das Deckgläschen mit Zellen bewachsen war, wurden diese entnommen, die MDCK-Zellen mit Methanol/Aceton (1:1) permeabilisiert, fixiert und die μ -Untereinheit-Expression mit einem monoklonalen Antikörper gegen das Flag-Tag und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper nachgewiesen. Zellklone, die eine grüne Fluoreszenz aufwiesen, wurden weiterkultiviert und für die langfristige Lagerung im Stickstofftank eingefroren. Wie in Abb. V.14. exemplarisch an jeweils einem Klon für jedes AP zu sehen, sind die μ -Untereinheiten im perinukleären Bereich der Zelle als distinkte Vesikel zu detektieren. Leider musste aber festgestellt werden, dass bereits nach drei bis vier Passagen kein Nachweis der μ -Untereinheiten mehr möglich war. Es scheint, als hätten die MDCK-Zellen die stabile Expression der μ -Untereinheiten nicht toleriert. Möglicherweise sind die positiven MDCK-Zellen gestorben und die Zellen, die keine AP-Untereinheiten kodierenden Plasmide tragen sondern nur das pIG-Resistenzplasmid, sind weiter gewachsen. Oder die MDCK-Zellen haben die AP-Plasmide zwar in ihr Genom integriert, aber ihre Expression „ausgeschaltet“, weil sie einen zu starken Eingriff in den zellulären Proteinhaushalt darstellen. Somit lässt sich schlussfolgern, dass es nicht möglich war, MDCK-Zellen zu etablieren, die die μ -Untereinheit der AP-Komplexe stabil exprimierende.

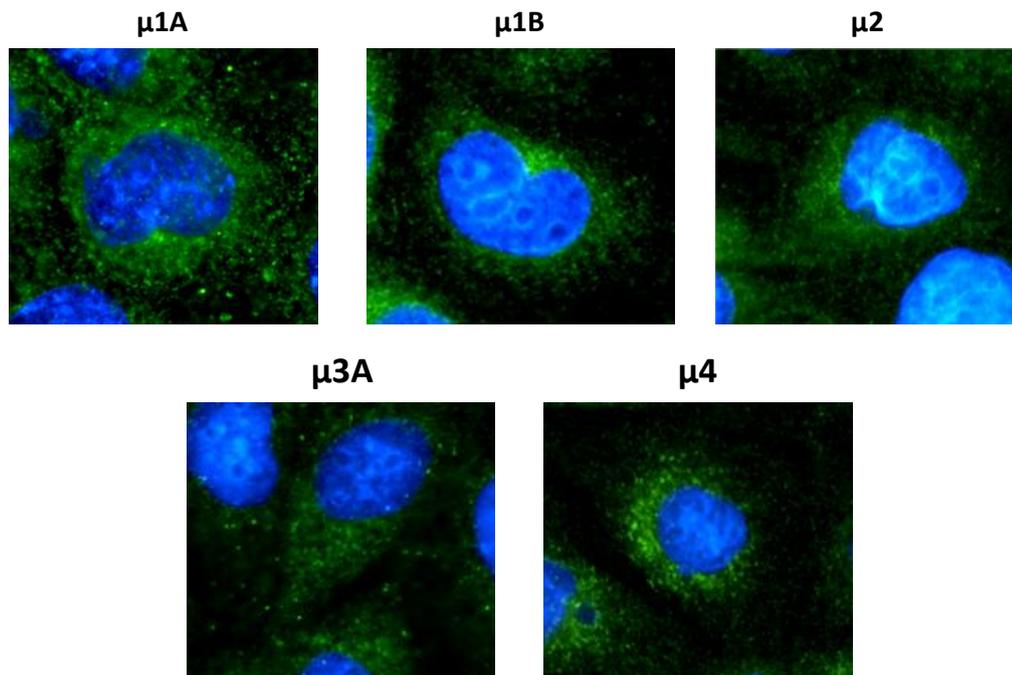


Abb. V.14.: Verteilung der stabil exprimierten μ -Untereinheiten der AP-Komplexe in MDCK-Zellen. Die stabil exprimierenden MDCK-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät, am nächsten Tag mit Methanol/Aceton (1:1) permeabilisiert und fixiert, anschließend mit einem monoklonalen anti-Flag-Antikörper (Sigma Aldrich, 1:400) und einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Axioplan, Fa. Zeiss, Vergrößerung: 63x

3.4. Untersuchung der Interaktion von endogenen AP-Komplexen und den wildtypischen NiV-Glykoproteinen in Vero-Zellen mittels Koimmunfluoreszenzanalyse

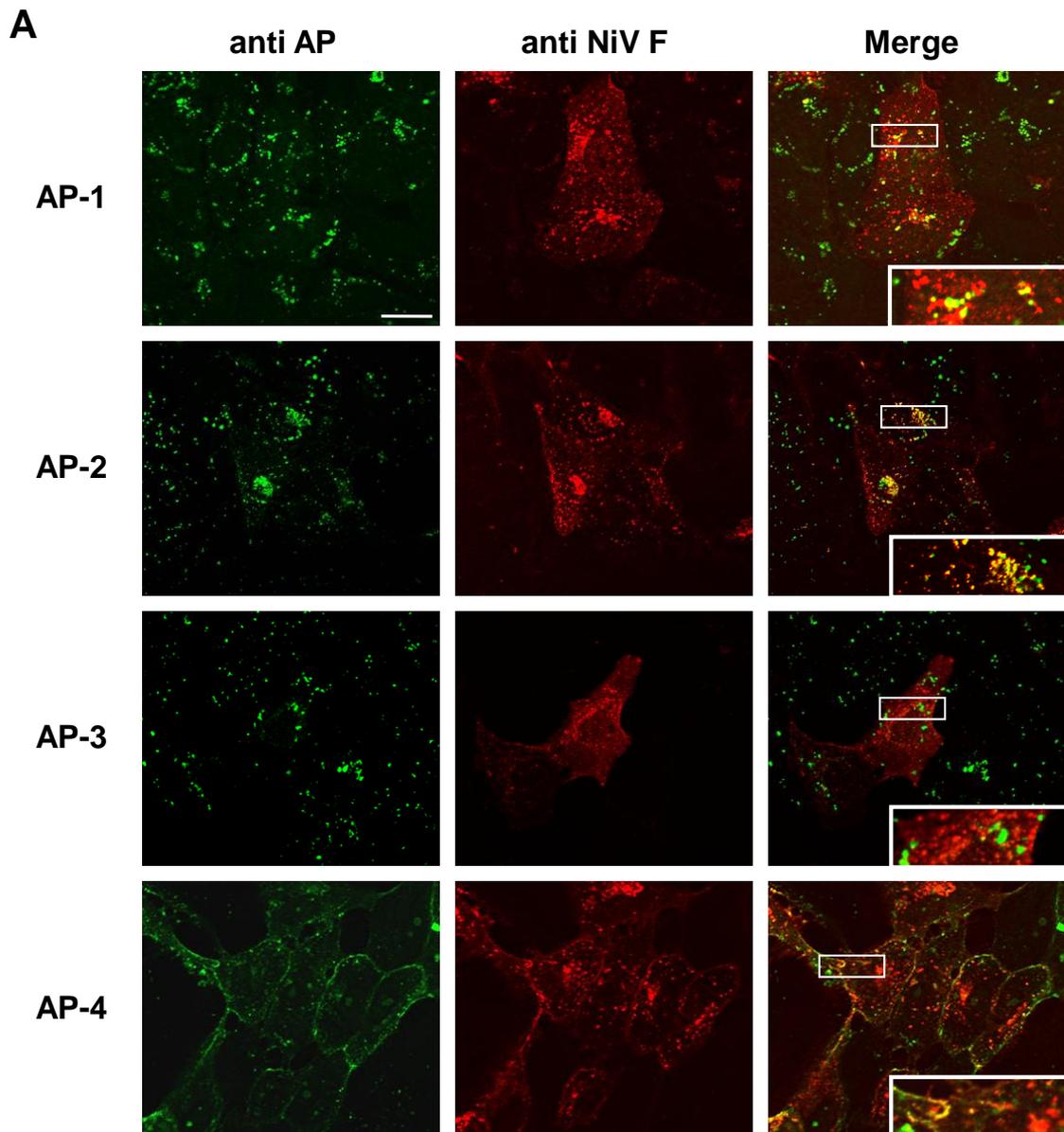
Da es weder möglich war, die endogenen AP-Komplexe in MDCK-Zellen nachzuweisen, noch durch transiente oder stabile Expression der μ -Untereinheiten der AP-Komplexe, Untersuchungen zur Interaktion mit den NiV-Glykoproteinen in MDCK-Zellen durchzuführen, wurde versucht die endogenen AP-Komplexe in Vero-Zellen zu detektieren. Hierfür wurden Vero-Zellen auf Deckgläschen ausgesät und wie in Kap. IV. 3.2.4. beschrieben am nächsten Tag entweder mit Methanol/Aceton (1:1) oder mit 2 % PFA/0,2 % TritonX-100 fixiert und permeabilisiert. Zum Austesten der optimalen Antikörperkonzentration wurden Antikörperverdünnungen von 1:10,

1:50, 1:100, 1:250 und 1:300 hergestellt und die Zellen damit inkubiert. Zum Detektieren der Primärantikörper wurden die MDCK-Zellen mit einem Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörper inkubiert. Für weitere Versuche wurde zum Permeabilisieren und Fixieren der Vero-Zellen mit Methanol/Aceton und die Verdünnung 1:100 verwendet, da diese Bedingungen in den Vero-Zellen die besten Ergebnisse lieferten.

Zur Untersuchung möglicher Kolo-kalisation der endogenen AP-Untereinheiten und den wildtypischen NiV-Glykoproteinen, wurden Vero-Zellen subkonfluent auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag durch Lipofektion (Kap. IV. 2.3.1) mit den Plasmiden kodierend für die F_{wt} bzw. G_{wt} transfiziert. 24 h p.t. wurden die auf der Zelloberfläche exprimierten Glykoproteine mit dem polyklonalen NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3) und einem nicht-fluoreszierenden Sekundärantikörper (anti-guinea pig/HRP) behandelt, um die Oberflächen-exprimierten Glykoproteine zu blocken. Nach Permeabilisieren und Fixieren der Zellen mit Methanol/Aceton (1:1) wurden die Zellen nochmals mit einem polyklonalen NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3, 1:500) sowie den polyklonalen Antikörpern gegen AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4 inkubiert. Die NiV-Glykoproteine wurden mittels eines Alexa Fluor 568- und die AP-Proteine durch einen Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörpers nachgewiesen.

Wie in Abb. V.15. zu sehen, konnten alle AP detektiert werden (vgl. anti AP, grün). NiV F_{wt} (vgl. Abb. V.15.A) ist zumindest teilweise in den gleichen Kompartimenten wie AP-1, AP-2 und AP-4 zu detektieren (siehe Detailausschnitt). Bei AP-3 hingegen ist keine signifikante Überlagerung festzustellen. Bei NiV G_{wt} ist, wie in Abb. V.15.B zu sehen weder bei AP-1, noch bei AP-2 und AP-3 eine Überlagerung der Fluoreszenzsignale zu detektieren. Lediglich für G_{wt} und AP-4 lassen sich Kolo-kalisationen feststellen.

Zusammenfassend lässt sich also sagen, dass NiV F_{wt} in Vero-Zellen mit AP-1, AP-2 und AP-4 kolo-kalisiert, während NiV G_{wt} nur mit AP-4 kolo-kalisiert.



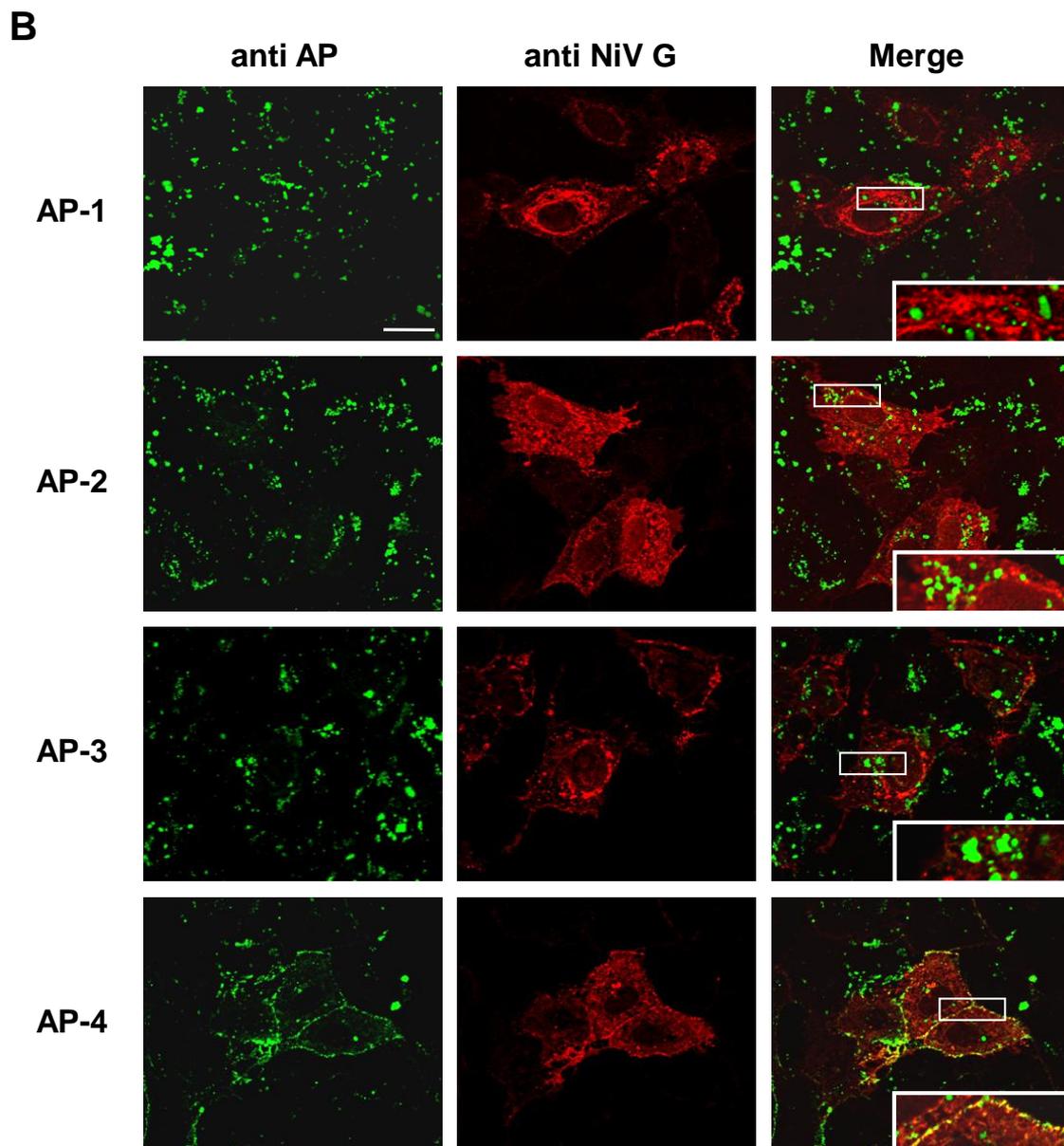


Abb. V.15.: Untersuchung von Kolo-kalisation der wildtypischen NiV-Glykoproteine und zellulären Adaptorproteinuntereinheiten. Vero-Zellen wurden auf Deckgläschen ausgesät und am nächsten Tag mit den Plasmiden kodierend für das NiV Fwt oder Gwt transfiziert. 24 h p.t. wurden die auf der Zelloberfläche exprimierten Glykoproteine mit einem polyklonalen NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3, 1:500) und mit einem nicht-fluoreszierenden Sekundärantikörper geblockt. Nach Permeabilisierung und Fixieren der Zellen mit Methanol/Aceton wurden die Zellen mit einem polyklonalen NiV-spezifischen Meerschweinchenserum (gp3, 1:500) und den spezifischen Antikörpern gegen AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4 (AP-1 Lifespan Biosciences; AP-2, AP-3 und AP-4 Santa Cruz Biotechnology) inkubiert. Die NiV-Glykoproteine wurden mittels eines Alexa Fluor 568- und die AP-Untereinheiten mittels eines Alexa Fluor 488-gekoppelten Sekundärantikörpers detektiert. Einzelne Bereiche wurden vergrößert als Detailansicht eingefügt. Axiovert 200M ApoTome Fa. Zeiss, Aufnahmen angefertigt von Prof. Dr. A. Maisner. Vergrößerung x630, Balken: 20 µm.

VI. Diskussion

Während der NiV-Infektion spielen polarisierte Epithelzellen in mehrerer Hinsicht eine entscheidende Rolle für die Ausbreitung des Virus. Früh in der Infektion repliziert das NiV, nachdem es über Aerosole in den Körper aufgenommen wurde, in den polarisierten Epithelzellen des Respirationstrakts und ist in der Lage diese Barriere zu überwinden. Dadurch kann NiV eine systemische Infektion verursachen, die schlussendlich zu einer fatalen Enzephalitis führen kann. Die sehr starke Infektion von Endothelzellen führt zur Vaskulitis, welche für die klinischen Symptome einer NiV-Infektion verantwortlich ist. Sowohl beim Schwein, als auch bei 50 % der infizierten Menschen führt die Infektion der Atemwegsepithelien zu einer symptomatischen respiratorischen Erkrankung.^(27, 87, 100, 119) Es wird vermutet, dass nur infizierte Menschen mit einer symptomatischen Infektion des Respirationstraktes für die Mensch-zu-Mensch Übertragung von NiV verantwortlich sind.⁽⁸⁷⁾ *In vivo* konnten außerdem infizierte Epithelzellen in der Niere und Blase detektiert werden, was die Vermutung nahelegt, dass das Virus ebenfalls in den Urin freigesetzt und ausgeschieden wird.^(26, 91, 98, 109, 163) Somit spielt das Epithelium nicht nur früh, sondern auch spät in der Infektion eine wichtige Rolle für die Ausbreitung und Übertragung des Virus.

In dieser Arbeit wurde der molekulare Mechanismus der Ausbreitung der NiV-Infektion in polarisierten Epithelzellen näher untersucht, wobei das Hauptaugenmerk auf die gerichtete Expression der NiV-Glykoproteine F und G und der involvierten zellulären Transportmechanismen lag.

Ausbreitung und *Budding* von NiV in polarisierten MDCK-Zellen

Die NiV-Infektion polarisierter MDCK-Zellen, führt zur Ausbildung sogenannter *foci* oder Synzytien, die durch Nachweis der viralen Proteine detektiert werden konnten (Abb. V.1.). Diese Beobachtung entspricht den Ergebnissen experimenteller *in vivo*-

Infektionen verschiedener Tiermodelle. So wurden beispielsweise Synzytien durch immunhistochemische Untersuchungen in den Epithelzellen des Respirationstraktes von infizierten Katzen, Frettchen und Schweinen festgestellt.^(15, 98, 108, 157) In MDCK-Zellen gewinnen die Synzytien mit fortschreitender Infektion in kurzer Zeit (7 h) deutlich an Umfang, was bedeutet, dass das NiV sich von Zelle zu Zelle ausbreiten kann. Diese Ausbreitung kann einerseits, wie es zum Beispiel für Influenza bekannt ist⁽¹¹³⁾, durch Freisetzen neu entstandener Viren über die apikale Membrandomäne und Neuinfektion benachbarter Zellen geschehen, andererseits aber auch durch Zell-Zell-Fusion über die lateralen Zellkontakte. Eine Beobachtung, die für die laterale Ausbreitung der Infektion spricht, ist der Verlust der E-Cadherin-Färbung innerhalb der Synzytien (Abb. V.1.). E-Cadherin gehört zu den typischen *adherens junction*-Proteinen in polarisierten Epithelzellen und wird in intakten, uninfizierten, polarisierten Zellen an den lateralen Zellkontakten exprimiert.⁽⁵⁶⁾ Die in NiV-induzierten Synzytien fehlende E-Cadherin-Färbung bedeutet, dass die *junctions* nicht mehr intakt, also die Zell-Zell-Kontakte unterbrochen sind. Ein Auflösen von Zellkontakten kann durch die Expression viraler Struktur- oder Nichtstrukturproteine hervorgerufen werden, wie es zum Beispiel für Hepatitis C, Hepatitis B oder Astroviren beschrieben wurde.^(5, 70, 75, 106) Für die NiV-Infektion ist diesbezüglich jedoch nichts bekannt, weshalb davon ausgegangen werden muss, dass virale Struktur- und Nichtstrukturproteine keine Bedeutung bei der Auflösung der *junctions* haben. Bei NiV scheinen hingegen die viralen Glykoproteine für den Verlust der Zellkontakte verantwortlich zu sein. Ein beträchtlicher Teil der NiV F- und G-Proteine lässt sich an den basolateralen Zellseiten detektieren (Abb. V.3.). Dies ist vor allem am Rande der Synzytien an den Kontaktstellen zu noch nicht infizierten Zellen festzustellen (siehe Pfeile in Abb. V.3.). Im Zentrum der Synzytien ist keine laterale Verteilung von F und G nachweisbar, da hier, wie die nicht mehr vorhandene E-Cadherin-Färbung zeigt, die Zellverbindungen bereits aufgelöst sind. Dies unterstützt eindeutig die Hypothese, dass die Virusausbreitung auf Nachbarzellen und die Zerstörung der Zell-Zell-Kontakte in polarisierten MDCK-Zellen durch die laterale Fusion, ausgelöst durch die fusogenen NiV-Glykoproteine, hervorgerufen wird. Gleiches konnte bereits für die MV-Glyko-

proteine gezeigt werden. Die basolaterale Sortierung löst hier in MDCK-Zellen Zell-Zell-Fusion aus, die durch apikale Umverteilung der H- und G-Proteine vollständig unterbunden wird.^(104, 131) Die Hypothese einer lateralen Virusausbreitung durch Zell-Zell-Fusion wird weiter untermauert, da vor 16 h nach Infektion mit NiV kein zellfreies Virus nachgewiesen werden kann (Abb. V.2.A), Synzytienbildung jedoch schon 13 h nach Infektion detektierbar ist (Abb. V.2.B). Es deutet also alles darauf hin, dass die Synzytienbildung Folge der lateralen Expression der NiV Glykoproteine ist, die durch ihre Fusogenität die Ausbreitung der Infektion zu benachbarten Zellen hervorrufen.

Neben der basolateralen Verteilung der NiV Glykoproteine in infizierten Zellen, fällt auf, dass eine große Menge davon auch apikal detektiert werden kann (vgl. Abb. V.3.). Dies könnte dafür sprechen, dass NiV an der apikalen Zellseite freigesetzt wird, zumal aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe zeigen, dass das Matrixprotein in infizierten Zellen ebenfalls rein apikal lokalisiert ist (Boris Lamp, persönliche Mitteilung). Bekannt ist, dass der Ort des *buddings* mit der Lokalisation des viralen Matrixproteins (M-Protein) zusammenhängt. Wie beispielsweise für das Masernvirus (MV) gezeigt werden konnte, hängt das apikale *budding* neuer Viren von der apikalen Sortierung des MV-Matrixproteins ab.⁽¹¹²⁾ Hier vermittelt das Matrixprotein sogar eine apikale Umverteilung der MV-Glykoproteine, die sonst in Abwesenheit des M-Proteins basolateral sortiert werden. Dass das NiV M-Protein ähnlich auf die Verteilung der Glykoproteine einwirkt ist jedoch unwahrscheinlich, denn wie in Abb. V. 10. zu sehen, ist auch in Abwesenheit aller viralen Proteine während transienter Expression neben der basolateralen auch eine apikale Lokalisation der Glykoproteine in Synzytien zu detektieren. Aktuelle Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe legen nahe, dass NiV von der apikalen Seite polarisierter Zellen freigesetzt wird (Erik Dietzel, persönliche Mitteilung), was im Einklang mit der massiven apikalen Lokalisation der Glykoproteine und des M-Proteins steht. Ebenfalls dafür spricht, dass NiV in Urin und in Ausscheidungen des Oropharynx von experimentell infizierten Tieren, wie Schweinen und Katzen, gefunden werden konnte.^(6, 98, 108, 157) Wahrscheinlich ist, dass dies durch

die Freisetzung der Viren von der dem Lumen zugewandten, also der apikalen Zellseite, ermöglicht wird.

Mögliche Problem bei der Untersuchung transient exprimierter NiV-Glykoproteine in polarisierten MDCK-Zellen

Werden die NiV-Glykoproteine transient in polarisierten MDCK-Zellen exprimiert, also ohne den Einfluss anderer viraler Proteine und unter Vermeidung des zytopathischen Effekts einer Infektion, wird sowohl F als auch G bipolar exprimiert (Abb. V.4.). Dies bestätigt zunächst die Ergebnisse der Infektion, in der beide Glykoproteine ebenfalls bipolar detektiert werden können (Abb. V.3.). Allerdings ist nicht sicher, dass die Polarität der transient transfizierten Zellen erhalten ist. Da die polarisierten Zellen zuvor zur Steigerung der Transfektionseffizienz mit Trypsin/EDTA behandelt werden mussten, geht die Polarität der Zellen vorübergehend verloren. Erst einige Stunden nach Zugabe von frischem Kulturmedium, welches auch das zur Ausbildung der *tight junctions* unbedingt benötigte Calcium enthält, schließt sich der Zellverband wieder und eine polarisierte Verteilung kann stattfinden. Diese Behandlung stellt insofern ein Problem dar, da nicht zu 100 % gewährleistet werden kann, dass diese kurzzeitige Aufhebung der Polarität keinen Einfluss auf die gerichtete Verteilung der Proteine hat. Zwar lässt sich überprüfen, dass zum Zeitpunkt der Immunfluoreszenzfärbung der Oberflächenproteine die Polarität wieder vollständig hergestellt ist, eine zuvor erfolgte Fehlverteilung der Proteine zu der apikalen oder basolateralen Membrandomäne lässt sich jedoch nicht ausschließen. Ein zweites Problem stellt die Überexpression transient transfizierter Proteine dar. Es ist bekannt, dass die starke Expression von Proteinen, wie sie auch für die NiV Glykoproteine F und G unter transients Expression festgestellt werden kann, trotz ihres normalerweise gerichteten Transports zur basolateralen Membrandomäne aufgrund des Proteinüberschusses zusätzlich zu einer apikalen Verteilung neben der eigentlich basolateralen führt.⁽⁹⁷⁾ Somit stellt das transiente Expressionssystem für die NiV-Glykoproteine nicht die optimale Methode zur Untersuchung der Lokalisation in polarisierten MDCK-Zellen dar.

Einfluss der Tyrosine im zytoplasmatischen Anteil der NiV-Glykoproteine auf die Lokalisation in stabil transfizierten MDCK-Zellen

Da also die transiente Expression einige Zweifel an der adäquaten Verteilung der NiV-Glykoproteine zulässt, wurden stabil exprimierende MDCK-Zellen untersucht. Hier konnte festgestellt werden, dass beide NiV-Glykoproteine größtenteils basolateral exprimiert werden. Das NiV G ist fast ausschließlich auf der basolateralen Membrandomäne nachweisbar. Das NiV F hingegen zeigt eine nicht ganz 100 %ige Stringenz dahingehend, dass ein Teil der Proteine auch auf der apikalen Zellseite detektiert werden kann. Dies bestätigt Ergebnisse vorhergehender Arbeiten.⁽¹⁵¹⁾

Signale für den basolateralen Transport durch die zelluläre Transport- und Sortiermaschinerie sind meist in den zytoplasmatischen Domänen von Transmembranproteinen in Form von kleinen Peptidmotiven kodiert. Dabei handelt es sich entweder um Tyrosinmotive der Konsensussequenz YXXØ (Y ist ein Tyrosin, X kann eine beliebige Aminosäure sein und Ø ist eine große hydrophobe Aminosäure) oder Leuzinmotive. Diese Motive sind darüberhinaus ebenfalls oft verantwortlich für die Endozytose der Transmembranproteine.⁽¹²⁾ Beide NiV Glykoproteine besitzen solche potentiellen Transportmotive. So findet man beim F-Protein drei Tyrosine, wobei das an der Position 525 (Y_SRL) in das klassische YXXØ-Konsensusmotiv passt. Für dieses konnte in früheren Arbeiten⁽¹⁵¹⁾ bereits gezeigt werden, dass es eine entscheidende Rolle bei der Endozytose und somit für die Aktivierung des F-Proteins spielt. Wird das Tyrosin gegen ein Alanin ausgetauscht, findet keine Endozytose des F-Proteins mehr statt, was dazu führt, dass die inaktive, nicht fusionsfähige Form des NiV F auf der Oberfläche der Zellen verbleibt. Die anderen beiden Tyrosine in der zytoplasmatischen Domäne des F-Proteins bilden zusammen ein Di-Tyrosinmotiv an der Position 542/543. Diesem Motiv konnte bis jetzt noch keine Funktion beim Transport oder bei der Endozytose zugeordnet werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte für das F-Protein gezeigt werden, dass das Tyrosin an der Position 525 im Motiv Y_SRL allein für den basolateralen Transport verantwortlich ist. Die F-Proteine, bei denen das Tyrosin 525 ausgetauscht wurde (F_{Y525A} und F_{YA}), konnten in polarisierten MDCK-Zellen ausschließlich auf der apikalen

Membrandomäne detektiert werden. Für eine Reihe zellulärer Proteine (z.B. *low-density lipoprotein* (LDL) *receptor*;⁽⁴⁶⁾) sind Motive in der Form YXXØ für den basolateralen Transport entscheidend. Auch für einige virale Glykoproteine ist bekannt, dass dieses Motiv für die gezielte basolaterale Verteilung benötigt wird. Das klassische Beispiel dafür ist das Vesikulären Stomatitis Virus (VSV) G-Protein. Es handelt sich hierbei um ein basolateral transportiertes Protein, welches in seiner zytoplasmatischen Domäne einen Tyrosinrest für den gerichteten Transport besitzt. Wird dieses Tyrosin mutiert, wird das VSV G-Protein in polarisierten Zellen nur noch apikal transportiert.⁽¹⁴⁸⁾ Im Gegensatz zur Mutation des YSRL-Motivs des NiV F-Proteins hatte die Mutation jedoch keinen Einfluss auf die Endozytose des VSV G-Proteins. Wie beim NiV-F überlappt jedoch das basolaterale Transport- und Endozytosesignal des gp160 des HIV. Dieses Protein besitzt insgesamt drei Tyrosine, wobei das sich der Transmembrandomäne am nächsten befindende Tyrosin in ein YXXØ-Motiv passt und für die Endozytose, sowie die basolaterale Sortierung des gp160 unerlässlich ist.⁽⁸⁶⁾ Ein weiteres Beispiel ist das MV F-Protein. Dieses besitzt in Form der YVRS�-Sequenz ein degeneriertes YXXØ-Motiv für den gezielten basolateralen Transport und die Endozytose.⁽¹⁰³⁾ Mutationen der Signale in den zytoplasmatischen Anteilen der MV-Glykoproteinen hatten einen Einfluss sowohl auf die basolaterale Verteilung als auch auf die Endozytose. Interessanterweise konnte für das Influenzavirus Hämagglutinin (HA) gezeigt werden, dass der Austausch des Cysteins an der Position 543 gegen ein Tyrosin die sonst apikale Verteilung völlig aufhebt. Mutiertes HA wurde vollständig zur basolateralen Membran in polarisierten Zellen transportiert.⁽¹⁷⁾ Dies macht eindrucksvoll deutlich, welchen großen Einfluss Tyrosin-abhängige Motive beim basolateralen Transport von Transmembranproteinen haben.

Die zytoplasmatische Domäne des G-Proteins weist ein klassisches Di-Leucinmotiv an der Position 42/43 auf, welches theoretisch als Signal für den basolateralen Transport, und die Endozytose fungieren könnte. Beispielsweise konnte durch Alaninscans der zytoplasmatischen Domäne des *mouse macrophage Fc receptor* (FcRII-B2) festgestellt werden, dass hier nicht Tyrosine sondern zwei Leucine die basolaterale Verteilung und die Endozytose vermitteln.^(67, 95) Gleiches ist auch für andere Proteine, z.B. CD4.⁽⁹²⁾

Überraschenderweise ist der basolaterale Transport des NiV G-Proteins jedoch nicht von dem Di-Leucin-Signal in seiner zytoplasmatischen Domäne abhängig. Möglicherweise liegt das daran, dass das Di-Leucin-Motiv des NiV G-Proteins nicht optimal in die bekannte Konsensussequenz (D/E)XXXL(L/I) passt.⁽¹²⁾ Stattdessen ist hier ein Di-Tyrosin-Motiv an der Position 28/29 für die basolaterale Verteilung des G-Proteins verantwortlich. Mutationen beider Tyrosine oder auch nur eines einzelnen führten zu einer apikalen Umverteilung des G-Proteins in polarisierten MDCK-Zellen. Bisher ist für kein weiteres Protein ein ähnliches basolaterales Sortierungssignal bekannt. Es könnte sich bei diesem Di-Tyrosin-Motiv theoretisch um eine sehr degenerierte Version des YXXØ-Motivs handeln, obwohl die umgebenden Aminosäuren in keinsten Weise dem bekannten Konsensusmotiv (YXXØ) entsprechen. Die Tatsache, dass das Di-Tyrosin-Motiv an der Position 542/543 des F-Proteins nicht als basolaterales Transportsignal benutzt wird, legt aber die Vermutung nahe, dass für die Funktionalität des Di-Tyrosin-Signals innerhalb des G-Proteins noch weitere Sequenzen oder eine bestimmte Konformation der zytoplasmatischen Domäne für die Wirkung als Transportsignal nötig zu sein scheinen. Es wird Aufgabe späterer Untersuchungen sein, die genaue Funktionsweise des Di-Tyrosin-Signals für den basolateralen Transport zu untersuchen.

Bis jetzt ist noch nicht vollständig geklärt, welche apikalen oder basolateralen Proteine direkt vom Golgi zur Plasmamembran, über das Endosomen oder gar über Transzytose an ihren Bestimmungsort gelangen.⁽¹²⁹⁾ Es ist aber vorstellbar, dass sogenannte Adaptorprotein(AP)-Komplexe hier eine Rolle spielen.

Dass beide NiV-Glykoproteine nach Mutation der entsprechenden Signale apikal exprimiert werden, deutet darauf hin, dass neben den Motiven für die basolaterale Verteilung starke intrinsische Signale für die apikale Sortierung vorhanden sind. Diese Signale sind häufig in der Transmembrandomäne oder im extrazellulären Bereich der Proteine lokalisiert.⁽¹³⁴⁾ Dabei handelt es sich oft um Glykane in der Ektodomäne der Transmembranproteine, wobei sowohl *N*- als auch *O*-Glykane dafür in Frage kommen.^(128, 133) Wahrscheinlich interagieren die Glykane mit Lektinen im *trans golgi*

network (TGN), woraufhin die glykosylierten Proteine in spezifische apikale Transportvesikel verpackt werden.⁽⁵⁸⁾ Ebenso könnte es aber auch sein, dass sie indirekt für den apikalen Transport verantwortlich sind, da sie dem Protein eine korrekte Faltung ermöglichen und somit die Interaktion der in der Proteinsequenz kodierten apikalen Signale mit der zellulären Transportmaschinerie erleichtern.⁽¹²⁸⁾ Grundsätzlich konkurrieren apikale und basolaterale Signalsequenzen um die Erkennung durch zelluläre Faktoren. Basolaterale Signale sind aber meist dominant. Sind also beide vorhanden, bestimmt immer das Signal für die basolaterale Verteilung die Lokalisierung der Proteine.⁽⁹⁷⁾ Dies würde erklären, warum die NiV Glykoproteine nach Inaktivierung der Signale für den basolateralen Transport rein apikal lokalisiert sind.

Das F-Protein besitzt soweit bekannt keine O-Glykane, aber insgesamt fünf N-Glykosylierungsstellen in der extrazellulären Domäne. Zwei von ihnen befinden sich in der F₁- und drei in der F₂-Untereinheit. Lediglich die beiden Glykane in der F₁-Untereinheit sind für einen korrekten Transport zur Zelloberfläche und eine vollständige Funktionalität des F-Proteins unablässig.⁽¹⁰²⁾ Es ist also vorstellbar, dass es sich bei diesen Glykanen um potentielle apikale Sortierungssignale handelt. Diese kämen aber nur zum Einsatz, wenn die Signale für den basolateralen Transport in der zytoplasmatischen Domäne der NiV-Glykoproteine z.B. durch Mutation nicht mehr funktionsfähig sind. Denkbar aber ist auch, dass bis jetzt nicht identifizierte Sequenzen in der Transmembrandomäne der NiV-Glykoproteine, wie es für das Hämagglutinin und die Neuraminidase von Influenza der Fall ist,^(73, 81) zu einer apikalen Verteilung führen.

Einfluss der Glykoproteinverteilung auf die Fusionsaktivität in polarisierten MDCK-Zellen

Wie bereits erwähnt spielt bei der Überwindung der Epithelbarriere beim Ein- und Austritt des Virus *in vivo* die Verteilung der fusogenen Glykoproteine eine große Rolle. Nur basolaterale Glykoproteine können Zell-Zell-Fusion induzieren und die polarisierte Epithelbarriere zerstören, damit das Virus zu den darunterliegenden Geweben

gelangen kann. Für beide NiV-Glykoproteine konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass sie basolateral exprimiert werden und dass dies von Tyrosinen in deren zytoplasmatischen Domänen abhängt. Die Frage die sich nun stellt ist, welche funktionelle Konsequenz die apikale Umverteilung der Glykoproteine *in vitro* hat und welche Schlussfolgerungen sich damit auf die Infektion *in vivo* ziehen lassen. Mit Hilfe eines Fusionsassays in polarisierten MDCK-Zellen konnte bestätigt werden, dass die Glykoprotein-induzierte Fusion von lateral lokalisiertem F und G abhängt. Wurde das wildtypische F-Protein zusammen mit dem wildtypischen G-Protein oder der basolateral lokalisierten Mutante G_{L41/42A} koexprimiert, konnte Fusion stattfinden (Abb. V.10.B). Im Gegensatz dazu war die apikal lokalisierte Mutante G_{Y28/29A} nicht mehr in der Lage Fusion zu induzieren. Dass diese Beobachtung tatsächlich auf das veränderte Transportverhalten des NiV G-Proteins zurückzuführen ist und nicht eine eingeschränkte Fusionsaktivität dieser Mutante für die fehlende Synzytienbildung ausschlaggebend ist, zeigt das uneingeschränkte Fusionsverhalten von G_{Y28/29A} in unpolarisierten MDCK-Zellen (Abb. V.10.A.). Damit passen die Ergebnisse zu früheren Arbeiten der Gruppe, die für die Glykoproteine des Masernvirus zeigten, dass die apikale Umverteilung in polarisierten Epithelzellen die Zell-Zell-Fusion verhindern kann.^(104, 131) Hier wurde anhand rekombinanter Viren demonstriert, dass die durch Mutation der basolateralen Sortierungssignale verursachte apikale Verteilung der Glykoproteine in polarisierten Epithelzellen zur Unterbindung der Ausbreitung der Infektion über die lateralen Zell-Zell-Verbindungen führt.

Gleichzeitig lässt sich feststellen, dass die Koexpression dieser Proteine zu einer bipolaren Verteilung sowohl des F- als auch des G-Proteins führt, genau wie es für die Verteilung beider Proteine in infizierten Zellen gefunden werden konnte. Dies kann dahingehend interpretiert werden, dass anders als man vermuten kann im viralen Kontext für die gerichtete Lokalisation von F und G, keine weiteren Faktoren eine Rolle zu spielen scheinen. Interessanterweise hat die Lokalisation des mutierten apikalen F-Proteins (F_{Y525A}) einen Einfluss auf die Verteilung des wildtypischen G-Proteins wenn beide koexprimiert werden. Die apikale Umverteilung des F-Proteins führt eindeutig zu einer ebenfalls apikalen Lokalisation des G-Proteins (Abb. V.11.B). Für die Hendravirus

(HeV)-Glykoproteine wird vermutet, dass sie erst nach dem Transport an die Zelloberfläche Komplexe eingehen.⁽¹⁵⁹⁾ Es konnte hier gezeigt werden, dass das HeV G-Protein sehr viel länger für die Oligomerisierung und den Weg durch den sekretorischen *pathway* braucht als das HeV F-Protein und deshalb eine Komplexierung beider Proteine bereits im ER nicht möglich ist und ein gemeinsamer Transport ausgeschlossen scheint. Dies scheint für die NiV-Glykoproteine nicht der Fall zu sein, denn die apikale Verteilung des F-Proteins kann die basolaterale Lokalisation des G-Proteins entscheidend verändern. Jedenfalls für polarisierte MDCK-Zellen ist also denkbar, dass das F- und das G-Protein während der Synthese auf dem Weg zur Plasmamembran in Verbindung treten und Komplexe ausbilden noch bevor sie die Plasmamembran erreichen und dann gemeinsam, aber in Abhängigkeit von F transportiert werden. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass die basolaterale G-Umverteilung nicht durch einen Kotransport mit apikalem F-Protein verursacht wird, sondern dass der durch Trypsin vorübergehend hervorgerufene Polaritätsverlust während der Transfektion zu einer fehlerhaften Verteilung der Proteine zur apikalen Membran führt, weshalb ein Teil des G-Proteins nach der Neusynthese apikal transportiert wird.

Die Rolle der Adaptorprotein(AP)-Komplexe für den basolateralen Transport der NiV-Glykoproteine

Beim Transport von Transmembranproteinen in der Zelle sind häufig AP-Komplexe beteiligt. Bislang sind vier verschiedene ubiquitär exprimierte Klassen bekannt: AP-1, AP-2, AP-3 und AP-4. AP-1, AP-3 und AP-4 spielen eine Rolle beim endosomalen/lysosomalen Transport, wohingegen AP-2 an der Endozytose von der Plasmamembran beteiligt ist. Jeder AP-Komplex enthält eine mittlere Untereinheit (μ), die mit Tyrosin-abhängigen Signalen interagieren kann.⁽¹²⁶⁾

Wie zu erwarten, ist das wildtypische F-Protein in der Koimmunfluoreszenzanalyse teilweise in den gleichen Kompartimenten wie das AP-2 nachweisbar. Für AP-2 wurde beschrieben, dass es über Erkennung des YXX ϕ -Motivs die Clathrin-vermittelte

Endozytose von Proteinen steuert.⁽¹²⁴⁾ In Anbetracht dessen und der Tatsache, dass das NiV F über Clathrin-vermittelte Endozytose nach Transport auf die Zelloberfläche wieder internalisiert wird, um im endosomalen Kompartiment durch zelluläre Cathepsine aktiviert zu werden,^(35, 36, 117, 151) muss man davon ausgehen, dass AP-2 dabei eine Rolle spielt. Bestätigt werden konnte die AP-2-Interaktion auch durch *yeast two-hybrid* (Y2H)-Analysen, die von Raffael Mattera (Labor von J.S. Bonifaccino, *National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, USA) parallel durchgeführte wurden (siehe Abbildung im Anhang, Abb. A.1.). Die Interaktion mit $\mu 2$ geht nach Mutation des Tyrosins an der Position 525 im YSRL-Motiv verloren, jedoch bleibt sie bestehen, wenn nur das Di-Tyrosin-Motiv (YY542/543) mutiert wird. Dies passt ebenfalls zu den Ergebnissen voriger Arbeiten, da nur das YXX \emptyset -Motiv in die Endozytose involviert zu sein scheint.⁽¹⁵¹⁾

Die Kolo-kalisation des NiV F-Proteins mit dem AP-1-Komplex lässt sich dahingehend interpretieren, dass AP-1 in der Lage ist, mit dem YSRL-Motiv des F-Proteins zu interagieren und somit den Transport über das endosomale System zu steuern. Da im Y2H-System auch das $\mu 1B$ in der Lage war mit NiV F zu interagieren (Abb. A.1.), ist vorstellbar, dass die Subform AP-1B in polarisierten MDCK-Zellen für den basolateralen Transport verantwortlich ist. Diese Vermutung stützt sich auch auf die Beobachtung, dass der zytoplasmatische Anteil des an Position 525 mutierten F-Proteins im Y2H-System nicht mehr in der Lage ist mit AP-1B zu interagieren. In der stabilen Expression in polarisierten MDCK-Zellen wurde die Mutante F_{Y525A} auch nicht mehr basolateral transportiert. Es liegt also nahe, dass AP-1B für den basolateralen Transport des NiV F-Proteins verantwortlich sein könnte, wie es schon für andere Proteine beschrieben wurde.^(50, 52)

Da in der Koimmunfluoreszenzanalyse (Abb. V.15.) und im Y2H-System (Abb. A.1.) AP-4 ebenfalls in der Lage war mit dem NiV F-Protein zu interagieren, könnte es möglich sein, dass AP-4 ebenfalls einen Einfluss auf den Transport des F-Proteins hat. AP-4 interagiert mit den zytoplasmatischen Anteilen von Proteinen über ein Motiv der Konsensussequenz DLYYDPM.⁽⁴⁾ Denkbar ist, dass das Di-Tyrosin-Motiv des F-Proteins für eine Interaktion mit AP-4 unter Umständen ausreicht. Die Mutation des Di-Tyrosin-

Motivs führt im Y2H-System jedenfalls zu einem völligen Interaktionsverlust mit AP-4, wohingegen eine schwache Interaktion bestehen bleibt, wenn nur das YSRL-Motiv mutiert wurde. Da das Di-Tyrosin-Motiv nur teilweise in das bekannte Konsensusmotiv passt, ist es möglich, dass AP-4 nur in schwache Verbindung mit dem NiV F-Protein treten kann, die für einen Transport nicht ausreichend stark sind. Dazu passt, dass die Interaktion des AP-4 mit dem Tyrosin-abhängigen Motiv einiger Proteine als außerordentlich schwach beschrieben wurde.⁽¹²⁶⁾

Da jedoch in den Kolokalisationsstudien keine Interaktion mit AP-3 sichtbar war, bleibt die Frage offen, warum das NiV F-Protein in Y2H-System eine klare Interaktion mit μ 3A eingeht, die verloren geht, wenn das YSRL-Motiv mutiert wurde. AP-3A hat einen Einfluss beim Transport über das endosomale System hin zum Lysosom. So wurden beispielsweise für lamp-1, lamp-2, limp-2 und CD63 beschrieben, dass sie über AP-3A zum Lysosomen transportiert werden.^(32, 33, 76) Da in unserer Arbeitsgruppe nie erhebliche Mengen F-Protein im Lysosomen detektiert werden konnten, ist unklar warum eine Interaktion mit AP-3A nachweisbar ist.

Bei der Interpretation der hier vorgestellten Ergebnisse zur Interaktion des NiV F-Protein mit den AP-Komplexen, muss man immer bedenken, dass die Untersuchungen der Kolokalisationsstudien in Vero-Zellen durchgeführt wurden, also einem anderen Zelltyp als der für die Lokalisationsanalysen verwendete (MDCK). Es kann nicht ganz ausgeschlossen werden kann, dass die Rolle der AP-Komplexe beim basolateralen Transport des NiV F-Proteins in MDCK-Zellen eine andere sein könnte. Beide NiV-Glykoproteine F und G werden in Endothelzellen in ihrer wildtypischen Form bipolar exprimiert⁽⁴⁴⁾ und die Mutationen der Transportsignale haben teilweise einen anderen Einfluss auf die Verteilung der Proteine als in Epithelzellen. Zum Beispiel führt hier nur die Mutation beider Tyrosinmotive zu einer apikalen Lokalisation des F-Proteins. Somit haben in Endothelzellen beide Signale zusammen eine Funktion als bipolares Sortierungssignal, während in polarisierten MDCK-Zellen das YXX \emptyset -Motiv allein für den basolateralen Transport ausreicht. Diese Unterschiede zeigen, dass es durchaus möglich ist, dass sich die Sortierung und damit auch die Interaktion mit AP-Komplexen in verschiedenen Zelltypen und damit auch in Vero- und MDCK-Zellen

unterscheiden können. Es müssten sicherlich entsprechende Untersuchungen auch in MDCK-Zellen durchgeführt werden, um konkreten Aufschluss geben zu können. Vorstellbar wäre hier ein gezielter *knock down* der AP-Komplexe durch Einsatz von siRNA.

Bei der Interpretation der Ergebnisse muss man ebenso bedenken, dass es sich bei dem Y2H-System um ein völlig anderes System als die Expression in Zellkultur handelt. Möglich ist, dass hier Interaktionen detektiert werden, die in z.B. MDCK-Zellen nicht bestehen.

Im Gegensatz zum F-Protein zeigte die Y2H-Methode überraschenderweise keinerlei Interaktion des G-Proteins mit den μ -Untereinheiten (vgl. Abb. A.1.) Das muss aber nicht bedeuten, dass es keine Interaktion gibt, da die Expression der zytoplasmatischen Domäne in diesem System nicht direkt kontrolliert werden kann und es sich nicht ausschließen lässt, dass mangels Expression keine Interaktion nachweisbar ist. Vorstellbar ist auch, dass die posttranslationale Modifikation in *Saccharomyces cerevisiae* eine andere Faltung der zytoplasmatischen Domäne hervorruft, was die Interaktion der μ -Untereinheiten mit den Signalen im G-Protein unterbinden könnte.

In der Koimmunfluoreszenzanalyse in Vero-Zellen ist für das G-Protein lediglich eine Interaktion mit dem AP-4, jedoch nicht mit AP-1, AP-2 und AP-3 nachzuweisen und könnte dahingehend gedeutet werden, dass keiner der anderen AP-Komplexe für den Transport von G eine Rolle spielt.

Da das G-Protein anders als das F-Protein nicht über Clathrin-vermittelte Endozytose von der Plasmamembran internalisiert, sondern über den normalen *turnover* der Zelle aufgenommen wird,⁽¹⁵¹⁾ ist erklärbar warum NiV G nicht mit AP-2 kolokalisiert. Auch ist nicht bekannt, dass das G-Protein über das Endosomen in das Lysosom transportiert wird, so wie es für mit AP-3A interagierende Proteine gezeigt wurde.⁽¹²⁶⁾ Eine Kolokalisation mit AP-3 in der Koimmunfluoreszenz war also auch nicht unbedingt zu erwarten. Interessant hingegen ist, dass das G-Protein nicht mit AP-1 jedoch mit AP-4 kolokalisiert, was dafür spricht, dass AP-4 in den basolateralen G-Transport involviert ist. Wie bereits erläutert, wurde für AP-4 beschrieben, dass es bei basolateralen Sortierung anderer Proteine beteiligt ist,^(50, 52, 137) wenngleich ein Di-Tyrosinmotiv mit

diesen umgebenden Aminosäuren wie es beim NiV G-Protein der Fall ist, nicht zu den typischen basolateralen Transportsignalen gehört.⁽⁴⁾ Da die Untersuchungen nicht in MDCK- sondern in Vero-Zellen durchgeführt werden konnten, bleibt es jedoch eine hypothetische Annahme, dass AP-4 auch in diesen Zellen für den basolateralen Transport zuständig sein könnte. Nicht auszuschließen ist, dass es in MDCK-Zellen gar keine direkte Interaktion zwischen dem G-Protein und AP-1B oder AP-4 gibt, sondern dass ein weiteres Protein mit einem spezifischen basolateralen Sortierungssignal eine Art Vermittlerrolle übernimmt. Ein solcher Mechanismus wurde beispielsweise für E-Cadherin beschrieben. Die *Phosphatidylinositol Phosphate Kinase* γ (PIPKI γ) interagiert mit E-Cadherin und vermittelt über ein YXX Φ -Motiv also indirekt den basolateralen Transport von E-Cadherin.⁽⁸³⁾

Bedeutung der basolateralen Verteilung der NiV-Glykoproteine für die Virusausbreitung *in vivo*

Der Respirationstrakt besteht hauptsächlich aus polarisierten Epithelzellen, aber auch aus spezialisierten Zellen, wie die Mukus-sekretierenden Becherzellen oder die M-Zellen als Teil des respiratorischen Lymphsystems.^(135, 160) Viele Mikroorganismen haben Mechanismen entwickelt, um diese Barriere zu überwinden und über den Respirationstrakt in den Körper zu gelangen. Für Reoviren wurde beispielsweise beschrieben, dass sie M-Zellen infizieren, um dann schlussendlich in das Lymphsystem zu gelangen.^(105, 160) Für Arenaviren hingegen wird diskutiert, dass das Eindringen in den Respirationstrakt über verlorengegangene Polarität und Integrität der Epithelzellbarriere hervorgerufen wird.⁽³⁸⁾ Das Masernvirus, welches als typischer Vertreter der Paramyxoviren ebenfalls über den Respirationstrakt in den Körper aufgenommen wird, infiziert nicht die Epithelzellen, sondern gelangt über intra-epitheliale dendritische Zellen in das Lymphsystem, wo es letztendlich Lymphozyten und Makrophagen infiziert.^(29, 30) Das NiV hingegen infiziert weder dendritische Zellen noch Lymphozyten oder Makrophagen. Es ist also sehr unwahrscheinlich, dass NiV über dendritische Zellen des Respirationstrakts in den Körper gelangt. Vielmehr geht man davon aus,

dass eine direkte Infektion der polarisierten Epithelzellen im Respirationstrakt zu einer Infektion darunterliegender Gewebe und zur Ausbreitung über das Blutssystem führt.⁽¹²⁷⁾ In der systemischen Phase kann NiV Lymphozyten jedoch als „Transportmittel“ benutzen,⁽⁹³⁾ um seine hauptsächlichen Zielzellen, Endothelzellen, effizient zu erreichen.⁽⁹¹⁾ Für die Ausbreitung der Infektion in polarisierten Epithelzellen spielt die polarisierte Verteilung der viralen Proteine, vor allem der Glykoproteine, eine entscheidende Rolle. Werden die Glykoproteine rein apikal exprimiert, wie es z.B. für das Influenzavirus der Fall ist, bleibt die Infektion lokal beschränkt. Werden die Glykoproteine jedoch auf der basolateralen Membrandomäne exprimiert und können diese die Fusion der benachbarten Zellen hervorrufen, wird die polarisierte Barriere zerstört und eine systemische Infektion kann erleichtert werden. Die Ausbreitung der Infektion über laterale Fusion von Nachbarzellen ermöglicht es somit auch Viren, die apikal freigesetzt werden, die Epithelbarriere zu zerstören und in das subepitheliale Gewebe zu gelangen.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die NiV-Infektion von polarisierten Epithelzellen zur Ausbildung von Synzytien führt. Diese Fusion benachbarter Zellen wird durch die basolaterale Verteilung der fusogenen NiV-Glykoproteinkomplexe hervorgerufen. Die basolaterale Lokalisation der Glykoproteine wird über Tyrosin-motive in den zytoplasmatischen Domänen des F- und G-Proteins vermittelt. Werden diese Tyrosine mutiert, werden beide Glykoproteine apikal transportiert und vermitteln keine Zell-Zell-Fusion mehr. Obwohl diese Untersuchungen in MDCK-Zellen, einer immortalisierten Nierenepithelzelllinie, durchgeführt wurden, kann man vermuten, dass auch in den polarisierten Epithelzellen des Respirationstraktes die basolaterale Verteilung des F- und G-Proteins die Zell-Zell-Fusion vermittelt. Dadurch wird die Barriere früh in der Infektion zerstört und ein Ausbreiten der Infektion in das subepitheliale Gewebe kann stattfinden (siehe Modell, Abb. VI.1.).

Aber nicht nur früh in der Infektion spielt die laterale Ausbreitung des NiV im Epithelverband eine große Rolle. In der systemischen Phase spät in der Infektion erreicht das Virus erneut den Respirationstrakt, aber auch die Epithelzellen der Niere und die Blase werden infiziert (siehe Modell, Abb. VI.1.). In experimentellen

Infektionen von Katzen, Meerschweinchen, Frettchen und Schweinen wurden Synzytien in vielen Organen, aber vor allem auch in den Epithelzellen des Respirationstraktes und des Harnapparates gefunden.⁽⁹¹⁾ Neben der Ausbreitung der Infektion durch Zell-Zell-Fusion und der damit verbundenen Zerstörung der Epithelbarriere findet in diesen Epithelzellen auch eine massive Produktion infektiöser Viren statt, die in respiratorische Sekrete und den Urin ausgeschieden werden können. Entsprechende Beobachtungen wurden bei infizierten Katzen und Schweinen gemacht.^(6, 98, 108, 157) Somit stellt die Zell-Zell-Fusion einen wichtigen Mechanismus für eine erfolgreiche Virusübertragung auf den nächsten Wirt dar.

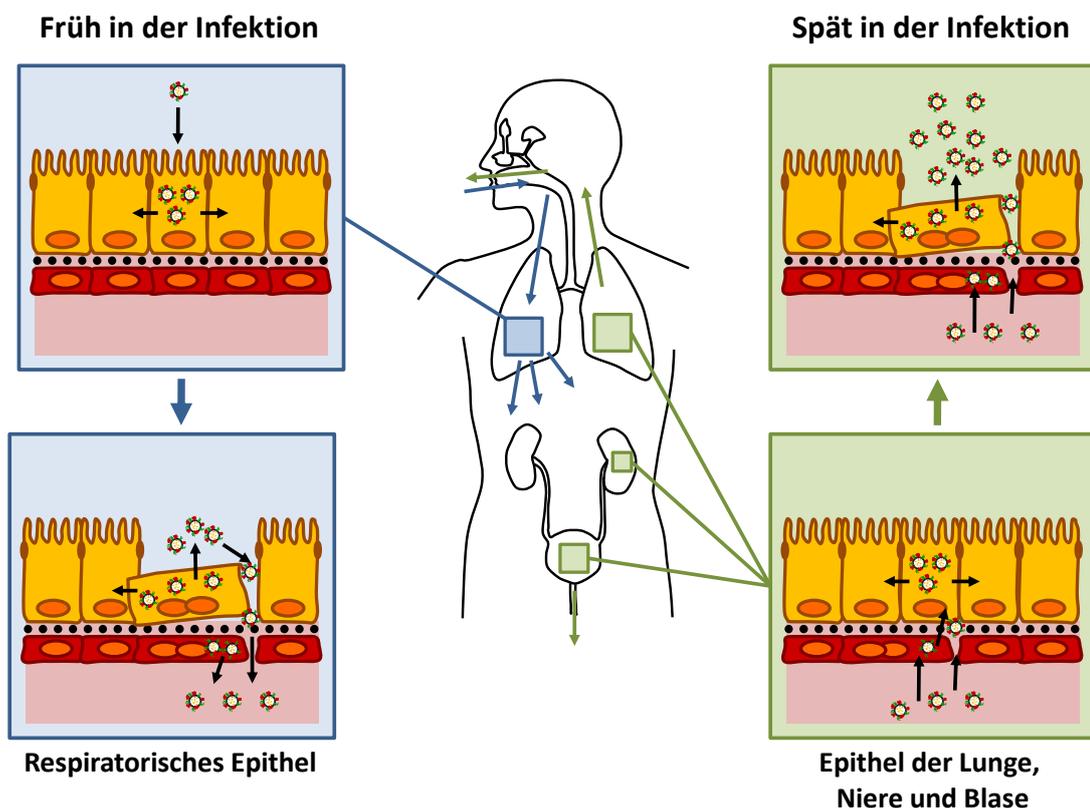


Abb. VI. 1.: Modell der Virusausbreitung früh und spät in der Infektion.

VII. Literaturverzeichnis

1. **AbuBakar, S., L. Y. Chang, A. R. Ali, S. H. Sharifah, K. Yusoff, and Z. Zamrod.** 2004. Isolation and molecular identification of Nipah virus from pigs. *Emerg Infect Dis* **10**:2228-2230.
2. **Aguilar, H. C., K. A. Matreyek, D. Y. Choi, C. M. Filone, S. Young, and B. Lee.** 2007. Polybasic KKR motif in the cytoplasmic tail of Nipah virus fusion protein modulates membrane fusion by inside-out signaling. *J Virol* **81**:4520-4532.
3. **Aguilar, H. C., K. A. Matreyek, C. M. Filone, S. T. Hashimi, E. L. Levrony, O. A. Negrete, A. Bertolotti-Ciarlet, D. Y. Choi, I. McHardy, J. A. Fulcher, S. V. Su, M. C. Wolf, L. Kohatsu, L. G. Baum, and B. Lee.** 2006. N-glycans on Nipah virus fusion protein protect against neutralization but reduce membrane fusion and viral entry. *J Virol* **80**:4878-4889.
4. **Aguilar, R. C., M. Boehm, I. Gorshkova, R. J. Crouch, K. Tomita, T. Saito, H. Ohno, and J. S. Bonifacino.** 2001. Signal-binding specificity of the mu4 subunit of the adaptor protein complex AP-4. *J Biol Chem* **276**:13145-13152.
5. **Benedicto, I., F. Molina-Jiménez, O. Barreiro, A. Maldonado-Rodríguez, J. Prieto, R. Moreno-Otero, R. Aldabe, M. López-Cabrera, and P. L. Majano.** 2008. Hepatitis C virus envelope components alter localization of hepatocyte tight junction-associated proteins and promote occludin retention in the endoplasmic reticulum. *Hepatology* **48**:1044-1053.
6. **Berhane, Y., H. M. Weingartl, J. Lopez, J. Neufeld, S. Czub, C. Embury-Hyatt, M. Goolia, J. Copps, and M. Czub.** 2008. Bacterial infections in pigs experimentally infected with Nipah virus. *Transbound Emerg Dis* **55**:165-174.
7. **Birnboim, H. C., and J. Doly.** 1979. A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res* **7**:1513-1523.
8. **Blank, C. A., D. A. Anderson, M. Beard, and S. M. Lemon.** 2000. Infection of polarized cultures of human intestinal epithelial cells with hepatitis A virus: vectorial release of progeny virions through apical cellular membranes. *J Virol* **74**:6476-6484.
9. **Bomsel, M., and K. Mostov.** 1991. Sorting of plasma membrane proteins in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* **3**:647-653.
10. **Bonaparte, M. I., A. S. Dimitrov, K. N. Bossart, G. Cramer, B. A. Mungall, K. A. Bishop, V. Choudhry, D. S. Dimitrov, L. F. Wang, B. T. Eaton, and C. C. Broder.** 2005. Ephrin-B2 ligand is a functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**:10652-10657.
11. **Bonifacino, J. S., and E. C. Dell'Angelica.** 1999. Molecular bases for the recognition of tyrosine-based sorting signals. *J Cell Biol* **145**:923-926.
12. **Bonifacino, J. S., and L. M. Traub.** 2003. Signals for sorting of transmembrane proteins to endosomes and lysosomes. *Annu Rev Biochem* **72**:395-447.
13. **Bossart, K. N., B. A. Mungall, G. Cramer, L. F. Wang, B. T. Eaton, and C. C. Broder.** 2005. Inhibition of Henipavirus fusion and infection by heptad-derived peptides of the Nipah virus fusion glycoprotein. *Virology* **2**:57.

14. **Bossart, K. N., L. F. Wang, M. N. Flora, K. B. Chua, S. K. Lam, B. T. Eaton, and C. C. Broder.** 2002. Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the Nipah virus and Hendra virus envelope glycoproteins. *J Virol* **76**:11186-11198.
15. **Bossart, K. N., Z. Zhu, D. Middleton, J. Klippel, G. Crameri, J. Bingham, J. A. McEachern, D. Green, T. J. Hancock, Y. P. Chan, A. C. Hickey, D. S. Dimitrov, L. F. Wang, and C. C. Broder.** 2009. A neutralizing human monoclonal antibody protects against lethal disease in a new ferret model of acute nipah virus infection. *PLoS Pathog* **5**:e1000642.
16. **Bowden, T. A., A. R. Aricescu, R. J. Gilbert, J. M. Grimes, E. Y. Jones, and D. I. Stuart.** 2008. Structural basis of Nipah and Hendra virus attachment to their cell-surface receptor ephrin-B2. *Nat Struct Mol Biol* **15**:567-572.
17. **Brewer, C. B., and M. G. Roth.** 1991. A single amino acid change in the cytoplasmic domain alters the polarized delivery of influenza virus hemagglutinin. *J Cell Biol* **114**:413-421.
18. **Brown, D. A., B. Crise, and J. K. Rose.** 1989. Mechanism of membrane anchoring affects polarized expression of two proteins in MDCK cells. *Science* **245**:1499-1501.
19. **CDC.** 1999. Outbreak of Hendra-like virus--Malaysia and Singapore, 1998-1999. *Can Commun Dis Rep* **25**:108-112.
20. **Cereijido, M., E. S. Robbins, W. J. Dolan, C. A. Rotunno, and D. D. Sabatini.** 1978. Polarized monolayers formed by epithelial cells on a permeable and translucent support. *J Cell Biol* **77**:853-880.
21. **Chadha, M. S., J. A. Comer, L. Lowe, P. A. Rota, P. E. Rollin, W. J. Bellini, T. G. Ksiazek, and A. Mishra.** 2006. Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India. *Emerg Infect Dis* **12**:235-240.
22. **Chi, S., H. Cao, J. Chen, and M. A. McNiven.** 2008. Eps15 mediates vesicle trafficking from the trans-Golgi network via an interaction with the clathrin adaptor AP-1. *Mol Biol Cell* **19**:3564-3575.
23. **Chong, H. T., A. Kamarulzaman, C. T. Tan, K. J. Goh, T. Thayaparan, S. R. Kunjapan, N. K. Chew, K. B. Chua, and S. K. Lam.** 2001. Treatment of acute Nipah encephalitis with ribavirin. *Ann Neurol* **49**:810-813.
24. **Chow, V. T., P. A. Tambyah, W. M. Yeo, M. C. Phoon, and J. Howe.** 2000. Diagnosis of nipah virus encephalitis by electron microscopy of cerebrospinal fluid. *J Clin Virol* **19**:143-147.
25. **Chua, K. B.** 2003. Nipah virus outbreak in Malaysia. *J Clin Virol* **26**:265-275.
26. **Chua, K. B., W. J. Bellini, P. A. Rota, B. H. Harcourt, A. Tamin, S. K. Lam, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, S. R. Zaki, W. Shieh, C. S. Goldsmith, D. J. Gubler, J. T. Roehrig, B. Eaton, A. R. Gould, J. Olson, H. Field, P. Daniels, A. E. Ling, C. J. Peters, L. J. Anderson, and B. W. Mahy.** 2000. Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* **288**:1432-1435.
27. **Chua, K. B., K. J. Goh, K. T. Wong, A. Kamarulzaman, P. S. Tan, T. G. Ksiazek, S. R. Zaki, G. Paul, S. K. Lam, and C. T. Tan.** 1999. Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* **354**:1257-1259.
28. **Chung, C. T., S. L. Niemela, and R. H. Miller.** 1989. One-step preparation of competent *Escherichia coli*: transformation and storage of bacterial cells in the same solution. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**:2172-2175.

29. **de Swart, R. L.** 2008. The pathogenesis of measles revisited. *Pediatr Infect Dis J* **27**:S84-88.
30. **de Witte, L., M. Abt, S. Schneider-Schaulies, Y. van Kooyk, and T. B. Geijtenbeek.** 2006. Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection. *J Virol* **80**:3477-3486.
31. **Delacour, D., and R. Jacob.** 2006. Apical protein transport. *Cell Mol Life Sci* **63**:2491-2505.
32. **Dell'Angelica, E. C., R. C. Aguilar, N. Wolins, S. Hazelwood, W. A. Gahl, and J. S. Bonifacino.** 2000. Molecular characterization of the protein encoded by the Hermansky-Pudlak syndrome type 1 gene. *J Biol Chem* **275**:1300-1306.
33. **Dell'Angelica, E. C., C. Mullins, and J. S. Bonifacino.** 1999. AP-4, a novel protein complex related to clathrin adaptors. *J Biol Chem* **274**:7278-7285.
34. **Diederich, S., and A. Maisner.** 2007. Molecular characteristics of the Nipah virus glycoproteins. *Ann N Y Acad Sci* **1102**:39-50.
35. **Diederich, S., M. Moll, H. D. Klenk, and A. Maisner.** 2005. The nipah virus fusion protein is cleaved within the endosomal compartment. *J Biol Chem* **280**:29899-29903.
36. **Diederich, S., L. Thiel, and A. Maisner.** 2008. Role of endocytosis and cathepsin-mediated activation in Nipah virus entry. *Virology* **375**:391-400.
37. **Drexler, J. F., V. M. Corman, F. Gloza-Rausch, A. Seebens, A. Annan, A. Ipsen, T. Kruppa, M. A. Müller, E. K. Kalko, Y. Adu-Sarkodie, S. Oppong, and C. Drosten.** 2009. Henipavirus RNA in African bats. *PLoS One* **4**:e6367.
38. **Dylla, D. E., D. E. Michele, K. P. Campbell, and P. B. McCray.** 2008. Basolateral entry and release of New and Old World arenaviruses from human airway epithelia. *J Virol* **82**:6034-6038.
39. **Egelman, E. H., S. S. Wu, M. Amrein, A. Portner, and G. Murti.** 1989. The Sendai virus nucleocapsid exists in at least four different helical states. *J Virol* **63**:2233-2243.
40. **Ellgaard, L., and A. Helenius.** 2003. Quality control in the endoplasmic reticulum. *Nat Rev Mol Cell Biol* **4**:181-191.
41. **Emi, N., T. Friedmann, and J. K. Yee.** 1991. Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *J Virol* **65**:1202-1207.
42. **Enserink, M.** 2004. Emerging infectious diseases. Nipah virus (or a cousin) strikes again. *Science* **303**:1121.
43. **Epstein, J. H., V. Prakash, C. S. Smith, P. Daszak, A. B. McLaughlin, G. Meehan, H. E. Field, and A. A. Cunningham.** 2008. Henipavirus infection in fruit bats (*Pteropus giganteus*), India. *Emerg Infect Dis* **14**:1309-1311.
44. **Erbar, S., and A. Maisner.** 2010. Nipah virus infection and glycoprotein targeting in endothelial cells. *Virol J* **7**:305.
45. **Field, H. E.** 2009. Bats and emerging zoonoses: henipaviruses and SARS. *Zoonoses Public Health* **56**:278-284.

46. **Fields, I. C., E. Shteyn, M. Pypaert, V. Proux-Gillardeaux, R. S. Kang, T. Galli, and H. Fölsch.** 2007. v-SNARE cellubrevin is required for basolateral sorting of AP-1B-dependent cargo in polarized epithelial cells. *J Cell Biol* **177**:477-488.
47. **Fuller, S., C. H. von Bonsdorff, and K. Simons.** 1984. Vesicular stomatitis virus infects and matures only through the basolateral surface of the polarized epithelial cell line, MDCK. *Cell* **38**:65-77.
48. **Fölsch, H.** 2008. Regulation of membrane trafficking in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* **20**:208-213.
49. **Fölsch, H.** 2005. The building blocks for basolateral vesicles in polarized epithelial cells. *Trends Cell Biol* **15**:222-228.
50. **Fölsch, H., P. E. Mattila, and O. A. Weisz.** 2009. Taking the scenic route: biosynthetic traffic to the plasma membrane in polarized epithelial cells. *Traffic* **10**:972-981.
51. **Fölsch, H., H. Ohno, J. S. Bonifacino, and I. Mellman.** 1999. A novel clathrin adaptor complex mediates basolateral targeting in polarized epithelial cells. *Cell* **99**:189-198.
52. **Gan, Y., T. E. McGraw, and E. Rodriguez-Boulan.** 2002. The epithelial-specific adaptor AP1B mediates post-endocytic recycling to the basolateral membrane. *Nat Cell Biol* **4**:605-609.
53. **Georges-Courbot, M. C., H. Contamin, C. Faure, P. Loth, S. Baize, P. Leyssen, J. Neyts, and V. Deubel.** 2006. Poly(I)-poly(C12U) but not ribavirin prevents death in a hamster model of Nipah virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **50**:1768-1772.
54. **Guillaume, V., H. Contamin, P. Loth, I. Grosjean, M. C. Courbot, V. Deubel, R. Buckland, and T. F. Wild.** 2006. Antibody prophylaxis and therapy against Nipah virus infection in hamsters. *J Virol* **80**:1972-1978.
55. **Guillaume, V., A. Lefevre, C. Faure, P. Marianneau, R. Buckland, S. K. Lam, T. F. Wild, and V. Deubel.** 2004. Specific detection of Nipah virus using real-time RT-PCR (TaqMan). *J Virol Methods* **120**:229-237.
56. **Gumbiner, B. M.** 2005. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:622-634.
57. **Gurley, E. S., J. M. Montgomery, M. J. Hossain, M. Bell, A. K. Azad, M. R. Islam, M. A. Molla, D. S. Carroll, T. G. Ksiazek, P. A. Rota, L. Lowe, J. A. Comer, P. Rollin, M. Czub, A. Grolla, H. Feldmann, S. P. Luby, J. L. Woodward, and R. F. Breiman.** 2007. Person-to-person transmission of Nipah virus in a Bangladeshi community. *Emerg Infect Dis* **13**:1031-1037.
58. **Gut, A., F. Kappeler, N. Hyka, M. S. Balda, H. P. Hauri, and K. Matter.** 1998. Carbohydrate-mediated Golgi to cell surface transport and apical targeting of membrane proteins. *EMBO J* **17**:1919-1929.
59. **Halpin, K., B. Bankamp, B. H. Harcourt, W. J. Bellini, and P. A. Rota.** 2004. Nipah virus conforms to the rule of six in a minigenome replication assay. *J Gen Virol* **85**:701-707.
60. **Hammerton, R. W., K. A. Krzeminski, R. W. Mays, T. A. Ryan, D. A. Wollner, and W. J. Nelson.** 1991. Mechanism for regulating cell surface distribution of Na⁺,K⁺-ATPase in polarized epithelial cells. *Science* **254**:847-850.

61. **Harcourt, B. H., A. Tamin, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, L. J. Anderson, W. J. Bellini, and P. A. Rota.** 2000. Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology* **271**:334-349.
62. **Harit, A. K., R. L. Ichhpujani, S. Gupta, K. S. Gill, S. Lal, N. K. Ganguly, and S. P. Agarwal.** 2006. Nipah/Hendra virus outbreak in Siliguri, West Bengal, India in 2001. *Indian J Med Res* **123**:553-560.
63. **Hirst, J., N. A. Bright, B. Rous, and M. S. Robinson.** 1999. Characterization of a fourth adaptor-related protein complex. *Mol Biol Cell* **10**:2787-2802.
64. **Hirst, J., L. D Barlow, G. C. Francisco, D. A. Sahlender, M. N. Seaman, J. B. Dacks, and M. S. Robinson.** 2011. The fifth adaptor protein complex. *PLoS Biol* **9**:e1001170.
65. **Hooper, P., S. Zaki, P. Daniels, and D. Middleton.** 2001. Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* **3**:315-322.
66. **Hsu, V. P., M. J. Hossain, U. D. Parashar, M. M. Ali, T. G. Ksiazek, I. Kuzmin, M. Niezgod, C. Rupprecht, J. Bresee, and R. F. Breiman.** 2004. Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* **10**:2082-2087.
67. **Hunziker, W., and C. Fumey.** 1994. A di-leucine motif mediates endocytosis and basolateral sorting of macrophage IgG Fc receptors in MDCK cells. *EMBO J* **13**:2963-2969.
68. **Jacob, R., M. Heine, M. Alfalah, and H. Y. Naim.** 2003. Distinct cytoskeletal tracks direct individual vesicle populations to the apical membrane of epithelial cells. *Curr Biol* **13**:607-612.
69. **Jarvis, M. A., C. E. Wang, H. L. Meyers, P. P. Smith, C. L. Corless, G. J. Henderson, J. Vieira, W. J. Britt, and J. A. Nelson.** 1999. Human cytomegalovirus infection of caco-2 cells occurs at the basolateral membrane and is differentiation state dependent. *J Virol* **73**:4552-4560.
70. **Javier, R. T.** 2008. Cell polarity proteins: common targets for tumorigenic human viruses. *Oncogene* **27**:7031-7046.
71. **Kaku, Y., A. Noguchi, G. A. Marsh, J. A. McEachern, A. Okutani, K. Hotta, B. Bazartseren, S. Fukushi, C. C. Broder, A. Yamada, S. Inoue, and L. F. Wang.** 2009. A neutralization test for specific detection of Nipah virus antibodies using pseudotyped vesicular stomatitis virus expressing green fluorescent protein. *J Virol Methods* **160**:7-13.
72. **Kirchhausen, T.** 1999. Adaptors for clathrin-mediated traffic. *Annu Rev Cell Dev Biol* **15**:705-732.
73. **Kundu, A., R. T. Avalos, C. M. Sanderson, and D. P. Nayak.** 1996. Transmembrane domain of influenza virus neuraminidase, a type II protein, possesses an apical sorting signal in polarized MDCK cells. *J Virol* **70**:6508-6515.
74. **Lamb, R. A., and D. Kolakofsky.** 2001. Paramyxoviridae: The virus and their replication. In *Fields Virology*, p. 1305-1340. *In* D. Knipe, P. Howley, D. Griffin, R. Lamb, M. Martin, B. Roizman, S. Straus, and eds (ed.), vol. 4th ed. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
75. **Lara-Pezzi, E., S. Roche, O. M. Andrisani, F. Sánchez-Madrid, and M. López-Cabrera.** 2001. The hepatitis B virus HBx protein induces adherens junction disruption in a src-dependent manner. *Oncogene* **20**:3323-3331.

76. **Le Borgne, R., A. Alconada, U. Bauer, and B. Hoflack.** 1998. The mammalian AP-3 adaptor-like complex mediates the intracellular transport of lysosomal membrane glycoproteins. *J Biol Chem* **273**:29451-29461.
77. **Lee, B., and Z. A. Ataman.** 2011. Modes of paramyxovirus fusion: a Henipavirus perspective. *Trends Microbiol* **19**:389-399.
78. **Lee, H., J. J. Song, E. Kim, C. O. Yun, J. Choi, B. Lee, J. Kim, J. W. Chang, and J. H. Kim.** 2001. Efficient gene transfer of VSV-G pseudotyped retroviral vector to human brain tumor. *Gene Ther* **8**:268-273.
79. **Lee, K. E., T. Umapathi, C. B. Tan, H. T. Tjia, T. S. Chua, H. M. Oh, K. M. Fock, A. Kurup, A. Das, A. K. Tan, and W. L. Lee.** 1999. The neurological manifestations of Nipah virus encephalitis, a novel paramyxovirus. *Ann Neurol* **46**:428-432.
80. **Leighton, J., Z. Brada, L. W. Estes, and G. Justh.** 1969. Secretory activity and oncogenicity of a cell line (MDCK) derived from canine kidney. *Science* **163**:472-473.
81. **Lin, S., H. Y. Naim, A. C. Rodriguez, and M. G. Roth.** 1998. Mutations in the middle of the transmembrane domain reverse the polarity of transport of the influenza virus hemagglutinin in MDCK epithelial cells. *J Cell Biol* **142**:51-57.
82. **Lindemann, D., T. Pietschmann, M. Picard-Maureau, A. Berg, M. Heinkelein, J. Thurow, P. Knaus, H. Zentgraf, and A. Rethwilm.** 2001. A particle-associated glycoprotein signal peptide essential for virus maturation and infectivity. *J Virol* **75**:5762-5771.
83. **Ling, K., S. F. Bairstow, C. Carbonara, D. A. Turbin, D. G. Huntsman, and R. A. Anderson.** 2007. Type I gamma phosphatidylinositol phosphate kinase modulates adherens junction and E-cadherin trafficking via a direct interaction with mu 1B adaptin. *J Cell Biol* **176**:343-353.
84. **Lisanti, M. P., and E. Rodriguez-Boulan.** 1990. Glycophospholipid membrane anchoring provides clues to the mechanism of protein sorting in polarized epithelial cells. *Trends Biochem Sci* **15**:113-118.
85. **Lo, M. K., and P. A. Rota.** 2008. The emergence of Nipah virus, a highly pathogenic paramyxovirus. *J Clin Virol* **43**:396-400.
86. **Lodge, R., J. P. Lalonde, G. Lemay, and E. A. Cohen.** 1997. The membrane-proximal intracytoplasmic tyrosine residue of HIV-1 envelope glycoprotein is critical for basolateral targeting of viral budding in MDCK cells. *EMBO J* **16**:695-705.
87. **Luby, S. P., M. J. Hossain, E. S. Gurley, B. N. Ahmed, S. Banu, S. U. Khan, N. Homaira, P. A. Rota, P. E. Rollin, J. A. Comer, E. Kenah, T. G. Ksiazek, and M. Rahman.** 2009. Recurrent zoonotic transmission of Nipah virus into humans, Bangladesh, 2001-2007. *Emerg Infect Dis* **15**:1229-1235.
88. **Luby, S. P., M. Rahman, M. J. Hossain, L. S. Blum, M. M. Husain, E. Gurley, R. Khan, B. N. Ahmed, S. Rahman, N. Nahar, E. Kenah, J. A. Comer, and T. G. Ksiazek.** 2006. Foodborne transmission of Nipah virus, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* **12**:1888-1894.
89. **Maisner, A., J. Alvarez, M. K. Liszewski, D. J. Atkinson, J. P. Atkinson, and G. Herrler.** 1996. The N-glycan of the SCR 2 region is essential for membrane cofactor protein (CD46) to function as a measles virus receptor. *J Virol* **70**:4973-4977.
90. **Maisner, A., H. Klenk, and G. Herrler.** 1998. Polarized budding of measles virus is not determined by viral surface glycoproteins. *J Virol* **72**:5276-5278.

91. **Maisner, A., J. Neufeld, and H. Weingartl.** 2009. Organ- and endotheliotropism of Nipah virus infections in vivo and in vitro. *Thromb Haemost* **102**:1014-1023.
92. **Marks, M. S., L. Woodruff, H. Ohno, and J. S. Bonifacino.** 1996. Protein targeting by tyrosine- and di-leucine-based signals: evidence for distinct saturable components. *J Cell Biol* **135**:341-354.
93. **Mathieu, C., C. Pohl, J. Szecsi, S. Trajkovic-Bodenec, S. Devergnas, H. Raoul, F. L. Cosset, D. Gerlier, T. F. Wild, and B. Horvat.** 2011. Nipah virus uses leukocytes for efficient dissemination within a host. *J Virol* **85**:7863-7871.
94. **Matter, K., and I. Mellman.** 1994. Mechanisms of cell polarity: sorting and transport in epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* **6**:545-554.
95. **Matter, K., E. M. Yamamoto, and I. Mellman.** 1994. Structural requirements and sequence motifs for polarized sorting and endocytosis of LDL and Fc receptors in MDCK cells. *J Cell Biol* **126**:991-1004.
96. **McEachern, J. A., J. Bingham, G. Cramer, D. J. Green, T. J. Hancock, D. Middleton, Y. R. Feng, C. C. Broder, L. F. Wang, and K. N. Bossart.** 2008. A recombinant subunit vaccine formulation protects against lethal Nipah virus challenge in cats. *Vaccine* **26**:3842-3852.
97. **Mellman, I., and W. J. Nelson.** 2008. Coordinated protein sorting, targeting and distribution in polarized cells. *Nat Rev Mol Cell Biol* **9**:833-845.
98. **Middleton, D. J., H. A. Westbury, C. J. Morrissy, B. M. van der Heide, G. M. Russell, M. A. Braun, and A. D. Hyatt.** 2002. Experimental Nipah virus infection in pigs and cats. *J Comp Pathol* **126**:124-136.
99. **Modrow, S., D. Falke, and U. Truyen.** 2003. *Molekulare Virologie*, p. 265-300, Paromyxoviren. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin.
100. **Mohd Nor, M. N., C. H. Gan, and B. L. Ong.** 2000. Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Rev Sci Tech* **19**:160-165.
101. **Moll, M., S. Diederich, H. D. Klenk, M. Czub, and A. Maisner.** 2004. Ubiquitous activation of the Nipah virus fusion protein does not require a basic amino acid at the cleavage site. *J Virol* **78**:9705-9712.
102. **Moll, M., A. Kaufmann, and A. Maisner.** 2004. Influence of N-glycans on processing and biological activity of the nipah virus fusion protein. *J Virol* **78**:7274-7278.
103. **Moll, M., H. D. Klenk, G. Herrler, and A. Maisner.** 2001. A single amino acid change in the cytoplasmic domains of measles virus glycoproteins H and F alters targeting, endocytosis, and cell fusion in polarized Madin-Darby canine kidney cells. *J Biol Chem* **276**:17887-17894.
104. **Moll, M., J. Pfeuffer, H. D. Klenk, S. Niewiesk, and A. Maisner.** 2004. Polarized glycoprotein targeting affects the spread of measles virus in vitro and in vivo. *J Gen Virol* **85**:1019-1027.
105. **Morin, M. J., A. Warner, and B. N. Fields.** 1996. Reovirus infection in rat lungs as a model to study the pathogenesis of viral pneumonia. *J Virol* **70**:541-548.
106. **Moser, L. A., M. Carter, and S. Schultz-Cherry.** 2007. Astrovirus increases epithelial barrier permeability independently of viral replication. *J Virol* **81**:11937-11945.

107. **Mostov, K. E., M. Verges, and Y. Altschuler.** 2000. Membrane traffic in polarized epithelial cells. *Curr Opin Cell Biol* **12**:483-490.
108. **Mungall, B. A., D. Middleton, G. Cramer, J. Bingham, K. Halpin, G. Russell, D. Green, J. McEachern, L. I. Pritchard, B. T. Eaton, L. F. Wang, K. N. Bossart, and C. C. Broder.** 2006. Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *J Virol* **80**:12293-12302.
109. **Mungall, B. A., D. Middleton, G. Cramer, K. Halpin, J. Bingham, B. T. Eaton, and C. C. Broder.** 2007. Vertical transmission and fetal replication of Nipah virus in an experimentally infected cat. *J Infect Dis* **196**:812-816.
110. **Mungall, B. A., N. C. Schopman, L. S. Lambeth, and T. J. Doran.** 2008. Inhibition of Henipavirus infection by RNA interference. *Antiviral Res* **80**:324-331.
111. **Mühlebach, M. D., M. Mateo, P. L. Sinn, S. Prüfer, K. M. Uhlig, V. H. Leonard, C. K. Navaratnarajah, M. Frenzke, X. X. Wong, B. Sawatsky, S. Ramachandran, P. B. McCray, K. Cichutek, V. von Messling, M. Lopez, and R. Cattaneo.** 2011. Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus. *Nature*.
112. **Naim, H. Y., E. Ehler, and M. A. Billeter.** 2000. Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells. *EMBO J* **19**:3576-3585.
113. **Nayak, D. P., E. K. Hui, and S. Barman.** 2004. Assembly and budding of influenza virus. *Virus Res* **106**:147-165.
114. **Negrete, O. A., E. L. Levroney, H. C. Aguilar, A. Bertolotti-Ciarlet, R. Nazarian, S. Tajyar, and B. Lee.** 2005. EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. *Nature* **436**:401-405.
115. **Negrete, O. A., M. C. Wolf, H. C. Aguilar, S. Enterlein, W. Wang, E. Mühlberger, S. V. Su, A. Bertolotti-Ciarlet, R. Flick, and B. Lee.** 2006. Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. *PLoS Pathog* **2**:e7.
116. **Neubrand, V. E., R. D. Will, W. Möbius, A. Poustka, S. Wiemann, P. Schu, C. G. Dotti, R. Pepperkok, and J. C. Simpson.** 2005. Gamma-BAR, a novel AP-1-interacting protein involved in post-Golgi trafficking. *EMBO J* **24**:1122-1133.
117. **Pager, C. T., W. W. Craft, J. Patch, and R. E. Dutch.** 2006. A mature and fusogenic form of the Nipah virus fusion protein requires proteolytic processing by cathepsin L. *Virology* **346**:251-257.
118. **Parashar, U. D., L. M. Sunn, F. Ong, A. W. Mounts, M. T. Arif, T. G. Ksiazek, M. A. Kamaluddin, A. N. Mustafa, H. Kaur, L. M. Ding, G. Othman, H. M. Radzi, P. T. Kitsutani, P. C. Stockton, J. Arokiasamy, H. E. Gary, and L. J. Anderson.** 2000. Case-control study of risk factors for human infection with a new zoonotic paramyxovirus, Nipah virus, during a 1998-1999 outbreak of severe encephalitis in Malaysia. *J Infect Dis* **181**:1755-1759.
119. **Paton, N. I., Y. S. Leo, S. R. Zaki, A. P. Auchus, K. E. Lee, A. E. Ling, S. K. Chew, B. Ang, P. E. Rollin, T. Umapathi, I. Sng, C. C. Lee, E. Lim, and T. G. Ksiazek.** 1999. Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet* **354**:1253-1256.
120. **Potter, B. A., R. P. Hughey, and O. A. Weisz.** 2006. Role of N- and O-glycans in polarized biosynthetic sorting. *Am J Physiol Cell Physiol* **290**:C1-C10.

121. **Pringle, C. R.** 1998. The universal system of virus taxonomy of the International Committee on Virus Taxonomy (ICTV), including new proposals ratified since publication of the Sixth ICTV Report in 1995. *Arch Virol* **143**:203-210.
122. **Proux-Gillardeaux, V., G. Raposo, T. Irinopoulou, and T. Galli.** 2007. Expression of the Longin domain of TI-VAMP impairs lysosomal secretion and epithelial cell migration. *Biol Cell* **99**:261-271.
123. **Rapoport, I., Y. C. Chen, P. Cupers, S. E. Shoelson, and T. Kirchhausen.** 1998. Dileucine-based sorting signals bind to the beta chain of AP-1 at a site distinct and regulated differently from the tyrosine-based motif-binding site. *EMBO J* **17**:2148-2155.
124. **Rapoport, J. Z.** 2008. Focusing on clathrin-mediated endocytosis. *Biochem J* **412**:415-423.
125. **Reynes, J. M., D. Counor, S. Ong, C. Faure, V. Seng, S. Molia, J. Walston, M. C. Georges-Courbot, V. Deubel, and J. L. Sarthou.** 2005. Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg Infect Dis* **11**:1042-1047.
126. **Robinson, M. S., and J. S. Bonifacino.** 2001. Adaptor-related proteins. *Curr Opin Cell Biol* **13**:444-453.
127. **Rockx, B., D. Brining, J. Kramer, J. Callison, H. Ebihara, K. Mansfield, and H. Feldmann.** 2011. Clinical outcome of henipavirus infection in hamsters is determined by the route and dose of infection. *J Virol* **85**:7658-7671.
128. **Rodriguez-Boulan, E., and A. Gonzalez.** 1999. Glycans in post-Golgi apical targeting: sorting signals or structural props? *Trends Cell Biol* **9**:291-294.
129. **Rodriguez-Boulan, E., G. Kreitzer, and A. Müsch.** 2005. Organization of vesicular trafficking in epithelia. *Nat Rev Mol Cell Biol* **6**:233-247.
130. **Rodriguez-Boulan, E., and W. J. Nelson.** 1989. Morphogenesis of the polarized epithelial cell phenotype. *Science* **245**:718-725.
131. **Runkler, N., E. Dietzel, M. Carsillo, S. Niewiesk, and A. Maisner.** 2009. Sorting signals in the measles virus wild-type glycoproteins differently influence virus spread in polarized epithelia and lymphocytes. *J Gen Virol* **90**:2474-2482.
132. **Scheiffele, P., and J. Füllekrug.** 2000. Glycosylation and protein transport. *Essays Biochem* **36**:27-35.
133. **Scheiffele, P., J. Peränen, and K. Simons.** 1995. N-glycans as apical sorting signals in epithelial cells. *Nature* **378**:96-98.
134. **Schuck, S., and K. Simons.** 2004. Polarized sorting in epithelial cells: raft clustering and the biogenesis of the apical membrane. *J Cell Sci* **117**:5955-5964.
135. **Shami, S. G., and M. J. Evans.** 1992. kinetics of pulmonary cells, In R. A. Parent (ed), *Comparative biology of the normal lung.*, p. 145-155, CRC Press, Boca Raton, FL.
136. **Sheff, D. R., R. Kroschewski, and I. Mellman.** 2002. Actin dependence of polarized receptor recycling in Madin-Darby canine kidney cell endosomes. *Mol Biol Cell* **13**:262-275.
137. **Simmen, T., S. Höning, A. Icking, R. Tikkanen, and W. Hunziker.** 2002. AP-4 binds basolateral signals and participates in basolateral sorting in epithelial MDCK cells. *Nat Cell Biol* **4**:154-159.

138. **Simons, K., and E. Ikonen.** 1997. Functional rafts in cell membranes. *Nature* **387**:569-572.
139. **Simons, K., and A. Wandinger-Ness.** 1990. Polarized sorting in epithelia. *Cell* **62**:207-210.
140. **Smith, E. C., A. Popa, A. Chang, C. Masante, and R. E. Dutch.** 2009. Viral entry mechanisms: the increasing diversity of paramyxovirus entry. *FEBS J* **276**:7217-7227.
141. **Soneoka, Y., P. M. Cannon, E. E. Ramsdale, J. C. Griffiths, G. Romano, S. M. Kingsman, and A. J. Kingsman.** 1995. A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res* **23**:628-633.
142. **Suckow, A. T., B. Craige, V. Faundez, W. J. Cain, and S. D. Chessler.** 2010. An AP-3-dependent mechanism drives synaptic-like microvesicle biogenesis in pancreatic islet beta-cells. *Am J Physiol Endocrinol Metab* **299**:E23-32.
143. **Sänger, C., E. Mühlberger, E. Ryabchikova, L. Kolesnikova, H. D. Klenk, and S. Becker.** 2001. Sorting of Marburg virus surface protein and virus release take place at opposite surfaces of infected polarized epithelial cells. *J Virol* **75**:1274-1283.
144. **Tai, A. W., J. Z. Chuang, and C. H. Sung.** 2001. Cytoplasmic dynein regulation by subunit heterogeneity and its role in apical transport. *J Cell Biol* **153**:1499-1509.
145. **Tamin, A., B. H. Harcourt, T. G. Ksiazek, P. E. Rollin, W. J. Bellini, and P. A. Rota.** 2002. Functional properties of the fusion and attachment glycoproteins of Nipah virus. *Virology* **296**:190-200.
146. **Tamin, A., B. H. Harcourt, M. K. Lo, J. A. Roth, M. C. Wolf, B. Lee, H. Weingartl, J. C. Audonnet, W. J. Bellini, and P. A. Rota.** 2009. Development of a neutralization assay for Nipah virus using pseudotype particles. *J Virol Methods* **160**:1-6.
147. **Tan, C. T., K. J. Goh, K. T. Wong, S. A. Sarji, K. B. Chua, N. K. Chew, P. Murugasu, Y. L. Loh, H. T. Chong, K. S. Tan, T. Thayaparan, S. Kumar, and M. R. Jusoh.** 2002. Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. *Ann Neurol* **51**:703-708.
148. **Thomas, D. C., C. B. Brewer, and M. G. Roth.** 1993. Vesicular stomatitis virus glycoprotein contains a dominant cytoplasmic basolateral sorting signal critically dependent upon a tyrosine. *J Biol Chem* **268**:3313-3320.
149. **Tucker, S. P., and R. W. Compans.** 1993. Virus infection of polarized epithelial cells. *Adv Virus Res* **42**:187-247.
150. **Vogt, C.** 2004. Diplomarbeit: Einfluss der Tyrosine in den zytoplasmatischen Domänen der Nipahvirus-Glykoproteine auf Endozytose und Transport in polarisierten Epithelzellen.
151. **Vogt, C., M. Eickmann, S. Diederich, M. Moll, and A. Maisner.** 2005. Endocytosis of the Nipah virus glycoproteins. *J Virol* **79**:3865-3872.
152. **Wacharapluesadee, S., and T. Hemachudha.** 2007. Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats. *J Virol Methods* **141**:97-101.
153. **Wacharapluesadee, S., B. Lumlerdacha, K. Boongird, S. Wanghongsa, L. Chanhom, P. Rollin, P. Stockton, C. E. Rupprecht, T. G. Ksiazek, and T. Hemachudha.** 2005. Bat Nipah virus, Thailand. *Emerg Infect Dis* **11**:1949-1951.

154. **Walpita, P., J. Barr, M. Sherman, C. F. Basler, and L. Wang.** 2011. Vaccine potential of Nipah virus-like particles. *PLoS One* **6**:e18437.
155. **Wang, L., B. H. Harcourt, M. Yu, A. Tamin, P. A. Rota, W. J. Bellini, and B. T. Eaton.** 2001. Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* **3**:279-287.
156. **Wang, L. F., M. Yu, E. Hansson, L. I. Pritchard, B. Shiell, W. P. Michalski, and B. T. Eaton.** 2000. The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae. *J Virol* **74**:9972-9979.
157. **Weingartl, H. M., Y. Berhane, and M. Czub.** 2009. Animal models of henipavirus infection: a review. *Vet J* **181**:211-220.
158. **Whelan, S. P., J. N. Barr, and G. W. Wertz.** 2004. Transcription and replication of nonsegmented negative-strand RNA viruses. *Curr Top Microbiol Immunol* **283**:61-119.
159. **Whitman, S. D., E. C. Smith, and R. E. Dutch.** 2009. Differential rates of protein folding and cellular trafficking for the Hendra virus F and G proteins: implications for F-G complex formation. *J Virol* **83**:8998-9001.
160. **Wolf, J. L., and W. A. Bye.** 1984. The membranous epithelial (M) cell and the mucosal immune system. *Annu Rev Med* **35**:95-112.
161. **Wong, K. T., I. Grosjean, C. Brisson, B. Blanquier, M. Fevre-Montange, A. Bernard, P. Loth, M. C. Georges-Courbot, M. Chevallier, H. Akaoka, P. Marianneau, S. K. Lam, T. F. Wild, and V. Deubel.** 2003. A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. *Am J Pathol* **163**:2127-2137.
162. **Wong, K. T., W. J. Shieh, S. Kumar, K. Norain, W. Abdullah, J. Guarner, C. S. Goldsmith, K. B. Chua, S. K. Lam, C. T. Tan, K. J. Goh, H. T. Chong, R. Jusoh, P. E. Rollin, T. G. Ksiazek, S. R. Zaki, and N. V. P. W. Group.** 2002. Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis. *Am J Pathol* **161**:2153-2167.
163. **Wong, K. T., W. J. Shieh, S. R. Zaki, and C. T. Tan.** 2002. Nipah virus infection, an emerging paramyxoviral zoonosis. *Springer Semin Immunopathol* **24**:215-228.
164. **Xu, Y., S. Gao, D. K. Cole, J. Zhu, N. Su, H. Wang, G. F. Gao, and Z. Rao.** 2004. Basis for fusion inhibition by peptides: analysis of the heptad repeat regions of the fusion proteins from Nipah and Hendra viruses, newly emergent zoonotic paramyxoviruses. *Biochem Biophys Res Commun* **315**:664-670.
165. **Yob, J. M., H. Field, A. M. Rashdi, C. Morrissy, B. van der Heide, P. Rota, A. bin Adzhar, J. White, P. Daniels, A. Jamaluddin, and T. Ksiazek.** 2001. Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis* **7**:439-441.
166. **Zhang, L., M. E. Peeples, R. C. Boucher, P. L. Collins, and R. J. Pickles.** 2002. Respiratory syncytial virus infection of human airway epithelial cells is polarized, specific to ciliated cells, and without obvious cytopathology. *J Virol* **76**:5654-5666.
167. **Zhu, Z., K. N. Bossart, K. A. Bishop, G. Cramer, A. S. Dimitrov, J. A. McEachern, Y. Feng, D. Middleton, L. F. Wang, C. C. Broder, and D. S. Dimitrov.** 2008. Exceptionally potent cross-reactive neutralization of Nipah and Hendra viruses by a human monoclonal antibody. *J Infect Dis* **197**:846-853.

168. **Zhu, Z., A. S. Dimitrov, K. N. Bossart, G. Crameri, K. A. Bishop, V. Choudhry, B. A. Mungall, Y. R. Feng, A. Choudhary, M. Y. Zhang, Y. Feng, L. F. Wang, X. Xiao, B. T. Eaton, C. C. Broder, and D. S. Dimitrov.** 2006. Potent neutralization of Hendra and Nipah viruses by human monoclonal antibodies. *J Virol* **80**:891-899.
169. **Zhu, Z., A. S. Dimitrov, S. Chakraborti, D. Dimitrova, X. Xiao, C. C. Broder, and D. S. Dimitrov.** 2006. Development of human monoclonal antibodies against diseases caused by emerging and biodefense-related viruses. *Expert Rev Anti Infect Ther* **4**:57-66.

VIII. Anhang

A.1. Untersuchung der Interaktion der wildtypischen und mutierten zytoplasmatischen Anteile der NiV-Glykoproteinen im *Yeast Two-Hybrid (Y2H)*-System

Um besseren Einblick in die molekularen Mechanismen der Interaktion der zytoplasmatischen Domänen mit den AP-Komplexen zu bekommen, wurde im Rahmen einer Kooperation mit Raffael Mattera (Labor von J.S. Bonifaccino, *National Institutes of Health*, Bethesda, Maryland, USA) die Interaktion der μ -Untereinheiten (AP-1A: μ 1A, AP-1B: μ 1B, AP-2: μ 2, AP-3A: μ 3 und AP-4: μ 4) und der zytoplasmatischen Domänen des wildtypischen G-Proteins sowie des wildtypischen und mutierten F-Proteine (F_{Y525A} und $F_{Y542/543A}$) im *yeast two-hybrid* (Y2H)-System untersucht. Hierfür wurden die wildtypischen zytoplasmatischen Anteile des NiV F- und G-Proteins in das Expressionsplasmid pGBKT7 durch Anfügen neuer Schnittstellen für Restriktionsendonukleasen (EcoRI, PstI) eingefügt. Außerdem wurde am 5'-Ende der Sequenz des G-Proteins ein Stopp-Codon angefügt, da hier im natürlichen Kontext keines vorhanden ist. Die Plasmide wurden Raffael Mattera zur Verfügung gestellt, der mithilfe des MATCHMAKER *Yeast Two-Hybrid*-System (Clontech) wie in Aguilar et al., 2001 beschrieben durchgeführt. Zur Untersuchung der Interaktion wurden die Gal4AD-Plasmide, die für die μ -Untereinheiten kodieren zusammen mit den Gal4BD-Plasmiden kodierend für das wildtypische und mutierte F-Protein, das wildtypische G-Protein und Kontrollprotein p53 kotransformiert und auf Leuzin- und Tryptophan-defiziente Agarplatten entweder mit oder ohne Histidin (-His oder +His) ausgestrichen.

Wie in Abb. V.16. zu sehen, sind alle Kotransformanten in Anwesenheit von Histidin in der Lage auf den Kontroll-Agarplatten zu wachsen, wie in der rechten Abbildung zu sehen ist.

Für das wildtypische G-Protein kann in diesem System keine Interaktion mit einer der μ -Untereinheiten festgestellt werden.

Für das wildtypische F-Protein lassen sich Interaktionen mit μ 1A, μ 1B, μ 2, μ 3A und μ 4 feststellen. Das sind die μ -Untereinheiten, die für das endosomale (μ 1A, μ 3A) und das basolaterale Sortierung (μ 1B, μ 4), sowie die Endozytose (μ 2) verantwortlich sind. Mit der μ 3B-Untereinheit, die lediglich in Neuronen vorkommt, ist keine Interaktion nachweisbar. Wird das Tyrosin an der Position 525 im Endozytose-Motiv \underline{Y} SRL gegen ein Alanin ausgetauscht, geht die Interaktion zu allen μ -Untereinheiten bis auf μ 4 verloren. Wird das Di-Leuzin-Motiv an der Position 542/543 mutiert, ist keine Interaktion mit μ 4 mehr zu detektieren, wohingegen mit μ 1B und μ 2 noch eine schwache Interaktion festzustellen ist. Dies lässt die Schlussfolgerung zu, dass das \underline{Y} SRL-Motiv primär mit der μ 1B-Untereinheit interagiert und deshalb AP-1B wahrscheinlich für den basolateralen Transport zuständig ist.

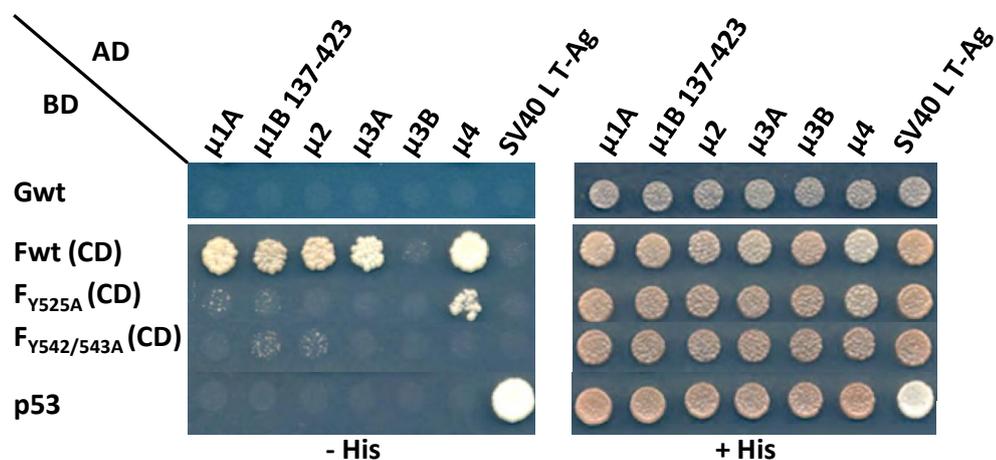


Abb. A.1.: Yeast Two-Hybrid-Analysen der Interaktion der verschiedenen μ -Untereinheiten mit den zytoplasmatischen Anteilen der NiV-Glykoproteine. Die Herstellung der Gal4AD Plasmide und die Durchführung des Yeast Two-Hybrid-Assays (Matchmaker, Clontech) sind wie in Aguilar et al., 2001⁽⁴⁾ durchgeführt worden. Die mit den Gal4AD- μ -Untereinheiten und der Gal4BD-Plasmiden kodierend für die wildtypischen bzw. mutierten zytoplasmatischen Anteile der NiV-Glykoproteine und das Kontrollprotein p53 kotransformierten Hefezellen wurden auf Agarplatten ohne Leuzin und Tryptophan in Ab- oder Anwesenheit von Histidin (-His bzw. +His) kultiviert. Diese Abbildung wurde von R. Mattera zur Verfügung gestellt.

A.2. Abkürzungen

A	Adenin
Abb.	Abbildung
AP	Adaptorprotein
AS	Aminosäure
bp	Basenpaare
BPB	Bromphenolblau
BRSV	Bovines Respiratorisches Synzytialvirus
BSA	Rinderserumalbumin
c	Konzentration
C	Celsius
C	Cytosin
CD	zytoplasmatische Domäne
CDV	Hundestaupavirus
cm	Zentimeter
C-Protein	Nichtstrukturprotein
Da	Dalton
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
dCTP	Desoxycytosintriphosphat
ddNTP	Didesoxynukleosidtriphosphat
def	deficient
dGTP	Desoxyguanosintriphosphat
dH ₂ O	deionisiertes Wasser
DMEM	Dulbecco's Minimal Essential Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
DOC	Desoxycholsäure
dTTP	Desoxythymosintriphosphat
E	Extinktion
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
ELISA	<i>Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay</i>
ER	endoplasmatisches Retikulum
<i>et al.</i>	<i>et aliter</i> (und andere)
FCS	Fötales Kälberserum
F-Protein	Fusionsprotein
FPV	Fowl Plaque Virus
<i>for</i>	<i>forward</i>
g	Erdbeschleunigungskonstante
g	Gramm
G	Guanin
GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i>
GPI	Glykosyl-Phosphatidyl-Inositol
G-Protein	Glykoprotein
h	Stunde
H	Hämagglutinin der Morbilliviren

H	Wasserstoff
HA	Hämagglutinin des Influenzavirus
HCMV	Humanes Cytomegalievirus
HeV	Hendravirus
HIV	Humanes Immundefizienz-Virus
HN	Hämagglutinin-Neuraminidase
HPIV	Humanes Parainfluenzavirus
H-Protein	Hämagglutinin des MV
HRP	<i>horsereadish peroxidase</i>
HRSV	Humanes Respiratorisches Synzytialvirus
Ig	Immunglobulin
IGS	intergenische Sequenz
IF	Immunfluoreszenz
IRES	<i>Internal Ribosomal Entry Site</i>
K	Kalium
k	Kilo
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
l	Liter
LB	<i>Liquid Broth</i>
LD	luminale Domäne
LDL	<i>Low Density Lipoproteins</i>
L-Protein	Polymerase
m	Meter
μ	Mikro
m	Milli
M	Molar
MDCK	<i>Madin-Darby Canine Kidney</i>
MEM	Minimal Essential Medium
MHC	<i>major histocompatibility complex</i>
min	Minute
M-Protein	Matrixprotein
mol	Mol
mRNA	<i>messengerRNA</i>
MuV	Mumpsvirus
MV	Masernvirus
n	Nano-
NA	Neuraminidase
Na	Natrium
NCAM	<i>Neural Cell Adhesion Molecule</i>
NDV	New Castle Disease Virus
NiV	Nipahvirus
nm	Nanometer
N-Protein	Nukleoprotein
nt	Nukleotid
OD	Optische Dichte
Ω	Ohm
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>

PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyethylenglykol
<i>Pfu</i>	<i>Pyrococcus furiosus</i>
pH	<i>potentia hydrogenii</i>
PIPKly	Phosphatidylinositol Phosphate Kinase ly
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
POX	Peroxidase
P-Protein	Phosphoprotein
p.t.	nach Transfektion
R	Widerstand
rER	rauhes ER
<i>rev</i>	<i>reverse</i>
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	<i>rounds per minute</i> (Upm)
RPV	Rinderpestvirus
RSV	Respiratorisches Synzytialvirus
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SAP	<i>Shrimp Alkaline Phosphatase</i>
SeV	Sendai Virus
ss	einzelsträngig
STAT	<i>Signal Transducers and Activators of Transcription</i>
SV5	Simian Virus 5
T	Thymin
Tab.	Tabelle
TBE	Tris-Borsäure-EDTA-Puffer
term.	terminal
TGN	trans-Golgi-Netzwerk
TMD	Transmembrandomäne
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSS	<i>Transformation and Storage Solution</i>
U	Einheit (<i>Unit</i>)
UpM	Umdrehungen pro Minute
UV	Ultraviolett
V	Volt
V-Protein	Nichtstrukturprotein
VSV	vesikuläres Stomatitis Virus
wt	Wildtyp
Y2H	<i>Yeast Two-Hybrid</i> (Hefe-zwei-Hybrid)
ZNS	Zentrales Nervensystem

A.4. Abbildungs- und Tabellenverzeichnis

Abb. II.1.:	Der natürliche Wirt. Der Flughund der Gattung Pteropus stellt das natürliche Reservoir des NiV dar.	5
Abb. II.2.:	Die geographische Verbreitung des natürlichen Wirtes sowie die Verteilung der Henipaviren	6
Abb. II.3.:	Struktur des Nipahvirus.	10
Abb. II.4.:	Genomorganisation der Nipahviren.	11
Abb. II.5.:	Schematische Darstellung des Replikationszyklus von NiV.	12
Abb. II.6.:	Schematische Darstellung der NiV-Glykoproteine.	15
Abb. II.7.:	Basolaterale und apikale Transportwege in polarisierten Epithelzellen. Schematische Darstellung der verschiedenen Wege des apikalen oder basolateralen Transportes in polarisierten Epithelzellen.	18
Abb. II.8.:	Schematische Darstellung der Adaptorprotein(AP)-Komplexe und ihrer Interaktion mit Clathrin.	22
Abb. IV.1.:	Schematische Darstellung der gerichteten Mutagenese.	38
Abb. IV.2.:	Schematische Darstellung des Transwell-Filter-Systems zur Kultivierung von polarisierten Epithelzellen	44
Abb. V.1.:	Infektion von polarisierten MDCK-Zellen.	62
Abb. V.2.:	NiV-Freisetzung und Synzytienbildung zu unterschiedlichen Zeitpunkten p.i. in polarisierten MDCK-Zellen.	64
Abb. V.3.:	Verteilung von F- und G-Proteinen in NiV-induzierten Synzytien.	66
Abb. V.4.:	Verteilung von transient exprimierten wildtypischen NiV-Glykoproteine auf der Oberfläche von polarisierten MDCK-Zellen.	68
Abb. V.5.:	Untersuchung der Oberflächenexpression des durch Lipofektion hergestellten stabil G_{wt} exprimierenden MDCK-Klon #2.	70
Abb. V.6.:	Untersuchung der Oberflächenexpression der durch Transduktion hergestellten stabil G_{wt} exprimierenden MDCK-Klone #4, #5 und #6.	71

Abb. V.7.:	Oberflächenverteilung der wildtypischen NiV-Glykoproteine in polarisierten MDCK-Zellen.	73
Abb. V.8.:	Schematische Darstellung und Sequenzen der zytoplasmatischen Domänen des NiV F- und G-Proteins und der verschiedenen Mutanten.	75
Abb. V.9.:	Oberflächenverteilung der NiV F- und G-Proteine mit Mutationen in den potentiellen Signalen innerhalb der cytoplasmatischen Anteile.	77
Abb. V.10.:	Fusionsaktivität und Oberflächenverteilung von wildtypischen und mutierten G-Proteinen bei Koexpression mit stabil exprimiertem F _{wt} .	79
Abb. V.11.:	Verteilung der NiV-Proteine in polarisierten MDCK-Zellen bei Koexpression von wildtypischen G-Proteinen mit F _{wt} und F _{Y252A} .	81
Abb. V.12.:	Agarosegel des Testverdau der ausgewählten Klone der μ -Untereinheiten in pCG.	85
Abb. V.13.:	Verteilung der transient transfizierten μ -Untereinheiten der AP-Komplexe in MDCK-Zellen.	87
Abb. V.14.:	Verteilung der stabil exprimierten μ -Untereinheiten der AP in MDCK-Zellen.	89
Abb. V.15.:	Untersuchung von Koloalisation der wildtypischen NiV-Glykoproteine und zellulären Adaptorproteinkomplexen.	92
Abb. VI. 1.:	Modell der Virusausbreitung früh und spät in der Infektion	109
Tab. II.1:	Charakteristische Vertreter der Paramyxoviridae.	3
Tab. V.1.:	Übersicht über die eingefügten Schnittstellen, die für den Testverdau verwendeten Restriktionsendonukleasen und die erwarteten Fragmente nach dem Testverdau.	85

Veröffentlichung im Zusammenhang mit dieser Arbeit:

Weise C., Erbar S., Lamp B., Vogt C., Diederich S., Maisner A. (2010) Tyrosine residues in the cytoplasmic domains affect sorting and fusion activity of the Nipah virus glycoproteins in polarized epithelial cells. *J Virol.*, **84**, 7634-41

Präsentationen:

Weise C., Diederich S., Vogt C. and Maisner A. (2008) Nipah virus glycoprotein expression in polarized epithelial cells; Annual Meeting of the Society of Virology (GfV), Heidelberg, Deutschland

Weise C., Diederich S., Vogt C. and Maisner A. (2008) Sorting of Nipah virus glycoprotein in polarized epithelial cells; 31. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Zellbiologie, Marburg, Deutschland

Weise C., Diederich S., Vogt C. and Maisner A. (2008) Surface distribution of Nipah virus glycoprotein in polarized epithelial cells, Meeting of the European Life Scientist Organization (ELSO), Nizza, Frankreich

Weise C., Diederich S., Vogt C. and Maisner A. (2008) Surface distribution of Nipah virus glycoprotein in polarized epithelial cells; Student-organized International Symposium of the DFG Graduate School 1216, Marburg, Deutschland

Weise C., Diederich S., Vogt C. and Maisner A. (2009) Distribution of Nipah virus glycoproteins on the surface of polarized epithelial cells, European Molecular Biology Organization Meeting (EMBO), Amsterdam, Niederlande

Weise C., Diederich S., Vogt C. and Maisner A. (2009) Distribution of Nipah virus glycoproteins on the surface of polarized epithelial cells; Networking meeting of the Research Training Groups GRK 845 and GRK 1216; Bad-Münster am Stein, Deutschland

Weise C., Lamp B., Diederich S., Erbar S. and Maisner A. (2010) Tyrosine residues in the cytoplasmic domains affect sorting of the Nipah virus glycoproteins in polarized epithelial cells; On-Site Evaluation of the Graduate School „Intra- and intercellular Transport and Communication“, Marburg, Deutschland

Weise C., Lamp B., Diederich S., Erbar S. and Maisner A. (2010) Spread of Nipah virus infection in polarized epithelial cells; 4th European Congress of Virology, Cernobbio, Italien

Weise C., Lamp B., Diederich S., Erbar S. and Maisner A. (2011) Basolateral transport of the NiV glycoproteins in polarized MDCK cells, 21st Annual Meeting of the Society for Virology Freiburg

Lamp B., Weise C. and Maisner A. (2011) Characterization of the Nipah virus matrix protein in polarized epithelial cells; 21st Annual Meeting of the Society for Virology Freiburg

Weise C., Lamp B., Diederich S., Erbar S. and Maisner A. (2011) Transport of the NiV glycoproteins to the basolateral membrane in polarized epithelial cells; 2. Student Organized International Symposium of the DFG Research Training Group 1216, Marburg, Deutschland

Lebenslauf

Persönliche Daten

Name	Carolin Weise
Geburtstag	27.07.1981 in Rathenow
Anschrift	Am Kornacker 66, 35041 Marburg
Familienstand	in fester Partnerschaft lebend

Berufliche Tätigkeit

Seit 09/2007	Anfertigung der Promotion in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Andrea Maisner, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg
--------------	--

Hochschulausbildung

2006 - 2007	Diplomarbeit am Institut für Virologie der Philipps-Universität, Marburg, Thema: „Aktivität gentechnisch veränderter Protease SKI-1/S1P nach Expression in Säuger- und Insektenzelle“
2006	Diplomprüfung in den Fächern Virologie, Genetik und Mikrobiologie
2004 - 2006	Studium der Biologie an der Phillips-Universität Marburg/Hessen
2001 - 2004	Studium der Biologie an der Johannes Gutenberg-Universität Mainz/ Rheinland-Pfalz

Schulbildung

1997 - 2001	Pestalozzigymnasiums Idstein/Hessen Abschluss Abitur
1992 - 1997	Holzlandgymnasium Hermsdorf/Thüringen
1988 - 1992	Grundschule Weißenborn/Thüringen

Fortbildung

30.09.-01.10.2008	„Konfokale Mikroskopie“; Workshop des Graduiertenkollegs, Philipps-Universität Marburg
28.-29.11.2008	Golin SciencePlus Workshop "Communication & presentation in the academic context: How to be confident and persuasive", Workshop des Graduiertenkollegs, Philipps-Universität Marburg
5.05.-31.06.2009	Scientific Writing, Workshop des Graduiertenkollegs, Philipps-Universität Marburg
25.11.2009	Golin SciencePlus Workshop "The oral examination for PhD candidates", Workshop des Graduiertenkollegs, Philipps-Universität Marburg
12.01.2010	"Projektmanagement in der Biotech-Industrie", Workshop des Graduiertenkollegs, Philipps-Universität Marburg
21.02.2011	Golin SciencePlus Workshop "Career planning for PhD students", Workshop des Graduiertenkollegs, Philipps-Universität Marburg
04. – 05.04.2011	„Wie bewerbe ich mich erfolgreich? Grundlagen der Bewerbung und Bewerbungsgespräch“, Workshop des Graduierten-zentrums Lebens- und Naturwissenschaften (MARA), Marburg
03. + 24.09.2011	“Gelassen und sicher im Stress“, Workshop des Graduierten-zentrums Lebens- und Naturwissenschaften (MARA), Marburg

Förderprogramme und Stipendien

01/2008 – 01/2009	assoziiertes Mitglied des Graduiertenkollegs 1216 „Intra- und Interzellulärer Transport und Kommunikation“ an der Philipps-Universität Marburg
Seit 01/2009	Stipendiat bzw. Angestellte des Graduiertenkollegs 1216 „Intra- und Interzellulärer Transport und Kommunikation“ an der Philipps-Universität Marburg

Danksagung

Bei Frau Prof. Dr. Andrea Maisner möchte ich mich für die Möglichkeit der Durchführung meiner Dissertation in Ihrer Arbeitsgruppe, für die Überlassung des spannenden Themas, die wissenschaftliche Betreuung und das Korrekturlesen meiner Arbeit bedanken. Herrn Prof. Dr. H.D. Klenk und Herrn Prof. Dr. S. Becker möchte ich für die hervorragenden Arbeitsbedingungen am Institut für Virologie danken.

Herrn Prof. Dr. Buckel danke ich für die Betreuung meiner Promotionsarbeit am Fachbereich Biologie und für die Erstellung des Gutachtens.

Den Mitgliedern des Graduiertenkollegs danke ich für die stetige Diskussionsbereitschaft und die vielen Anregungen für meine Arbeit. Dem Graduiertenkolleg möchte ich für die finanzielle Unterstützung und die Bereitstellung der Möglichkeit zum regen Austausch mit anderen Wissenschaftlern an der Uni aber auch mit internationalen Kollegen durch Ermöglichung vieler Kongressbesuche danken.

Ich bedanke mich bei Carola Vogt für die zur Verfügungstellung diverser Plasmide und stabil exprimierenden Zellen, die sie in ihrer Diplomarbeit angefertigt hat, sowie die Vorarbeiten zu diesem Thema. Steffi möchte ich für die Überlassung von Plasmiden aus der AG Jürgen Schneider-Schaulies und für die Hilfe bezüglich des retroviralen Gentransfersystems danken.

Mein Dank gilt auch Raffael Mattera aus dem Labor von J.S. Bonifaccino (*National Institutes of Health, Bethesda, Maryland, USA*). Er hat für mich die Y2H-Versuche durchgeführt und mir die Expressionsplasmide der μ -Untereinheiten der AP-Komplexe, die in der Arbeitsgruppe von J.S. Bonifaccino hergestellt wurden, zu Verfügung gestellt.

Bei Katrin bedanke ich mich für die tolle Betreuung meines Praktikums in der Virologie. Sie hat mir den ersten Einblick in das Feld der virologischen Forschung gegeben und damit meine spätere Orientierung erheblich beeinflusst. Anna danke ich besonders für die super Betreuung während meiner Diplomarbeit in der AG Garten. Sie hat mich in so mancher Durststrecke in Sachen Klonierung unterstützt und mir die Entscheidung

erleichtert mit er wissenschaftlichen Forschung fortzufahren. Beide sind in dieser Zeit auch über das wissenschaftlich hinaus zu Freunden geworden.

Dr. Sandra Diederich und Dr. Steffi Erbar möchte ich ein herzliches Dankeschön für die zahlreichen Versuche im BLS-4 entgegenbringen. Ihr habt einen großen Teil zum Gelingen der Arbeit beigetragen.

Ein ganz großes Dankeschön geht an die jetzigen und ehemaligen Mitglieder der AG Maisner: Anja, Benne, Boris, Erik, Eva, Isabelle, Lena, Lisa, Lucie, Maria, Michael, Nicole, Sandra und Steffi. Ihr habt mir über so einige Schaffenskrise hinweg geholfen und gezeigt, dass Wissenschaft und der Laboralltag Spaß machen kann. Aber auch private Unternehmungen mit euch habe ich genossen.

Ein weiteres Dankeschön möchte ich meinen ehemaligen Praktikanten widmen, die mir viel bei speziellen Versuchen geholfen und mir gezeigte haben, wie gut mir Betreuungsarbeit gefällt: Lena, Thomas, Isabelle und Robert.

Ich bedanke mich bei allen Mitgliedern des Instituts für Virologie für das angenehme Arbeitsklima und die stetige Hilfsbereitschaft. Ein riesiges Dankeschön geht dabei an all die Kollegen, die über die Zeit zu Freunden geworden sind. Besonders erwähnt werden sollen hier meine „Teegruppe“, die „Mädels“ und neuerdings die „Sushi-Mädels“. Aber auch bei den restlichen Mitgliedern der AG Becker, AG Garten, AG Schwarz, AG Weber und der umgezogenen AG Mühlberger (besonders Tini☺) möchte ich mich für unterhaltsame Pausen, private Unternehmungen, aufmunternden Wort und wissenschaftliche Diskussionen bedanken. Nicht zu vergessen sind die Spülfrauen, die uns allen den Arbeitsalltag sehr erleichtern.

Bei Steffi, Erik, Ina, Katharina, Boris und Frank möchte ich mich ganz herzlich für die Korrektur meiner Arbeit bedanken. Ihr habt mir damit sehr geholfen!

Für das atemberaubende Titelbild möchte ich mich bei Carsten bedanken. Ich weiß, dass es viel Zeit gekostet und Mühe gemacht hat. Aber es hat sich gelohnt!

In diesem Zusammenhang möchte ich auch Larissa herzlich danken. Sie hat mir die schönen EM-Aufnahmen zur Verfügung gestellt. Zusammen mit Ulla und später auch Anne hat sie mich im Labor begleitet und war immer für wissenschaftliche Diskussion aber auch private Gespräche (beispielsweise Pilze) zu haben. Ulla ist mir während ihrer Masterarbeit besonders ans Herz gewachsen. Die Spaziergänge in der Mittagspause und die Pralinen-Abende haben so viel Spaß gemacht.

Ein lieber Dank geht an Kerstin Schipper, die mir mit ihrem wissenschaftlichen Wissen aber vor allem als Freundin immer zur Seite steht!

Ein ganz besonderes Dankeschön gebührt meiner ganzen Familie. Ohne eure finanzielle und seelisch-moralische Unterstützung hätte ich das Studium und somit die Dissertation nicht durchführen können. Ihr wart immer da für mich. TAUSEND DANKE!!!

Ganz lieb bedanken möchte ich mich bei meinem Freund Bernd, der nun schon einige Jahre an meiner Seite ist und mich immer und zu jeder Zeit in jeder erdenklichen Weise unterstützt, auch wenn das angesichts mancher Stress-Launen sicher nicht immer leicht war ☺

Ehrenwörtliche Erklärung

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die dem Fachbereich Biologie Marburg zur Promotionsprüfung eingereichte Arbeit mit dem Titel:

**„Die Nipahvirus Glykoproteine
Ihre Verteilung in infizierten und transfizierten polarisierten Epithelzellen und die
Identifizierung basolateraler Transportsignale“**

Im Institut für Virologie des Fachbereichs Medizin der Philipps-Universität Marburg unter Leitung von Frau Prof. Dr. A. Maisner ohne sonstige Hilfe durchgeführt habe und bei der Abfassung der Arbeit keine anderen als die in der Dissertation angeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Teile der vorliegenden Arbeit sind im *Journal of Virology* veröffentlicht.

(Ort/Datum)

(Unterschrift mit Vor- und Zuname)