

Untersuchungen zur Inhibition Paramyxo- und Flavivirus-induzierter Membranfusion

**Dissertation zur Erlangung des
naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der**

**Bayerischen
Julius-Maximilians-Universität
Würzburg**



vorgelegt von

Katrin Singethan

aus Karlsruhe

Würzburg, 2009

Eingereicht am: 13.02.2009

Mitglieder der Promotionskommission:

Vorsitzender: Professor Dr. M. J. Müller

Gutachter: Professor Dr. Jürgen Schneider-Schaulies

Gutachter: Professor Dr. Georg Krohne

Tag des Promotionskolloquiums: 10.06.2009

Doktorurkunde ausgehändigt am:

Erklärung:

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation in allen Teilen selbständig angefertigt und keine anderen als die genannten Hilfsmittel und Quellen benutzt habe.

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

Ich habe bisher, außer den mit dem Zulassungsgesuch urkundlichen Graden, keine weiteren akademischen Grade erworben oder zu erwerben versucht.

Würzburg, den 11. Februar 2009



Katrin Singethan

Inhalt

1	Einleitung.....	5
1.1	Epidemiologie und Pathogenese der Paramyxovirus-Infektionen	5
1.2	Biologie der Morbilliviren MV, CDV sowie des Henipavirus NiV	10
1.2.1	Taxonomie	10
1.2.2	Morphologie	11
1.2.3	Genomaufbau	13
1.2.4	Funktion der Paramyxovirus-Hüllproteine.....	14
1.3	Epidemiologie und Pathogenese des Flavivirus Dengue.....	18
1.4	Biologie des Dengue-Virus	22
1.4.1	Taxonomie	22
1.4.2	Morphologie	22
1.4.3	Genomaufbau	23
1.4.4	Funktion der Flavivirus Hüllproteine	23
1.5	Klasse I- und II-Fusionsproteine	26
1.6	Chemotherapeutische antivirale Ansätze.....	28
1.7	Ziele der Arbeit	29
2	Material	31
2.1	Zellen.....	31
2.2	Viren.....	32
2.3	Bakterien	32
2.4	Plasmide	33
2.5	Nukleotide und siRNAs	35
2.6	Primerpaare.....	35
2.7	Nährmedien und Seren.....	37
2.8	Lösungen und Puffer	37
2.9	Antikörper	40
2.9.1	Primärantikörper.....	40
2.9.2	Sekundärantikörper.....	41
2.9.3	Direkt markierte Substanzen	41
2.9.4	Fluoreszenzfarbstoffe.....	41
2.10	Chemikalien, Enzyme und Peptide	41
2.10.1	Enzyme	41
2.10.2	Restriktionsenzyme	42
2.10.3	Chemikalien	42

2.11	Peptide, inhibitorische Substanzen und Toxine.....	44
2.12	Kits.....	46
2.13	Verbrauchsmaterial	46
2.14	Geräte.....	47
3	Methoden	49
3.1	Zellbiologische Methoden.....	49
3.1.1	Zellkultur adhärenter und in Suspension wachsender Zellen	49
3.1.2	Einfrieren und Auftauen von Zellen	49
3.1.3	Gewinnung von Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene	50
3.1.4	Zellzählung.....	51
3.1.5	Kultur von Hybridomzellen zur Antikörpergewinnung	52
3.1.6	MTT-Vitalitätstest.....	52
3.2	Virologische Methoden.....	53
3.2.1	Infektion von adhärenenten Zellen.....	53
3.2.2	Infektions-Inhibitions-Versuche mit Antikörpern und inhibitorischen Substanzen	53
3.2.3	Transfektions-Inhibitions-Versuche mit Antikörpern und inhibitorischen Substanzen	53
3.2.4	Transfektions-Assays	53
3.2.5	Vermehrung von Dengue-Virus-Serotypen.....	54
3.2.6	Virusvermehrung verschiedener Paramyxoviren	54
3.2.7	Virustiterbestimmung mittels Plaquetitration.....	54
3.2.8	Virustiterbestimmung mittels TCID50 Test (50 % - Endpunkt-Titration)	55
3.2.9	Virustitration von Dengue-Virus mittels Immunfluoreszenz.....	55
3.2.10	Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel	56
3.3	Histochemische Methoden	58
3.3.1	Immunfluoreszenzfärbungen für die Durchflußzytometrie	58
3.3.2	Immunfluoreszenzfärbungen für die Mikroskopie.....	58
3.3.3	AK-Labeling mit AlexaFluor® 488 (Monoclonal Antibody Labeling Kit)	59
3.3.4	Färbungen für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)	59
3.3.5	Färbung mit Kristallviolettlösung	59
3.4	Molekularbiologische Methoden	60
3.4.1	Herstellung kompetenter Bakterien.....	60
3.4.2	Transformation von Bakterien	60
3.4.3	QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit	60
3.4.4	Midi-Plasmid-Präparation (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)	61
3.4.5	QIAprep Spin Miniprep-Kit.....	61
3.4.6	Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen.....	61
3.4.7	Sequenzierung	62
3.4.8	Gelelektrophorese von Nukleinsäuren.....	62
3.4.9	Polymerase-Kettenreaktion (PCR).....	63
3.4.10	Restriktionsverdau	63

3.4.11	Auffüllen überhängender Enden mit Klenow-Polymerase	64
3.4.12	Dephosphorylierung von Plasmidvektoren.....	64
3.4.13	Ligation	64
3.4.14	Ethanol-fällung.....	64
3.4.15	Reverse Transkription von mRNA	65
3.4.16	Gel-Extraktion von DNA-Fragmenten (Quiaquick Gel extraction Kit).....	65
3.4.17	Gel-Extraktion von DNA-Fragmenten durch Glasmilch-Kit (NucleoTrap kit)	65
3.4.18	RNA-Isolation (GenElute Mammalian Total RNA Isolation Kit)	66
3.4.19	Gezielte Mutagenese (QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit).....	66
3.5	Proteinbiochemische Methoden.....	68
3.5.1	Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern	68
3.5.2	Fab-Fragment-Herstellung und -Reinigung.....	68
3.5.3	Proteinbestimmung mittels BCA.....	69
3.5.4	Herstellung von Zelllysaten für die Analyse zytoplasmatischer und membrangebundener Proteine	69
3.5.5	Gelelektrophorese von Proteinen.....	69
3.5.6	Western-Blot-Analyse.....	70
4	Ergebnisse.....	72
4.1	Der Fusions-Inhibitionsmechanismus des mAK K41 gegen CD9 bei der CDV-Infektion.....	72
4.1.1	mAK K41 gegen CD9 verursacht Veränderungen in der Membranstruktur von Kulturzellen.....	72
4.1.2	Umlagerung der CD9-Moleküle nach mAK K41-Inkubation.....	83
4.1.3	Untersuchung der Kontakte von CD9 mit anderen Molekülen	84
4.1.4	Verdrängung der CDV-Proteine durch netzartige CD9-Strukturen	89
4.2	Etablierung eines Inhibitor-Testsystems für die Paramyxovirus-Fusion	91
4.2.1	Zellvitalität nach der Behandlung mit ausgewählten Substanzen.....	92
4.2.2	Untersuchungen von Inhibitoren gegen CDV.....	95
4.2.3	Untersuchungen von Inhibitoren gegen MV.....	100
4.2.4	Untersuchungen von Inhibitoren gegen NiV.....	105
4.3	Etablierung eines Inhibitor-Testsystems für die Dengue-Virusaufnahme.....	109
4.3.1	Klonierung des Dengue E-Proteins aus pMT-DV2-4 in den pCG-Vektor	109
4.3.2	Versuch der Etablierung eines Testsystems zur Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel mit pCG-DV3.....	114
4.3.3	Klonierung des E-Proteins aus pCG-DV3 in pCG-eGFP.....	115
4.3.4	Dengue-Virus Infektion zur Isolierung der E-Protein-cDNA	122
4.3.5	DENV-Infektion zur Untersuchung kleiner Inhibitormoleküle	126
5	Diskussion.....	129
6	Zusammenfassung	144
7	Summary.....	146
8	Abkürzungsverzeichnis	148

9	Literaturverzeichnis	149
10	Posterpräsentationen, Vorträge und Publikationen	168
11	Lebenslauf	169

1 Einleitung

1.1 Epidemiologie und Pathogenese der Paramyxovirus-Infektionen

Die Familie Paramyxoviridae umfasst Viren mit einer einzelsträngigen, nichtsegmentierten, linearen RNA mit negativer Polarität als Genom. Zu den Paramyxoviridae gehören Virusspezies, deren Infektion besonders im oberen Respirationstrakt ihren Verlauf nimmt (z. B. das Respiratory syncytial virus der Unterfamilie Pneumovirinae) oder sich von diesem nach einer primären Infektion ausbreiten (Spezies der Unterfamilie Paramyxovirinae). Bei nahezu allen Mitgliedern der Paramyxoviren ist die Virusverbreitung durch Aerosole und Tröpfcheninfektion der primäre Infektionsweg. In der Unterfamilie der Paramyxovirinae sind die Morbilliviren des Menschen durch das Masern-Virus (MV) und beim Tier unter anderem durch das Hundestaupe-Virus (CDV) vertreten (Griffin et al., 2001; Murphy et al., 1999).

Die Pathogenese der Morbilliviren ist am besten beim MV erforscht. Wie alle Mitglieder dieser Virusfamilie ist MV hochinfektiös und löst jährlich weltweit 30 Mio. Erkrankungen aus. Dabei wird die Sterberate nach verschiedenen Literaturangaben zwischen 0,005 % (RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten) und 0,2 % (Epidemiology & Prevention of Vaccine-Preventable Diseases) aller Masern-Erkrankten in Industrieländern angegeben. Durch gezielte Maßnahmen der WHO (insbesondere Erhöhung der Masern-Durchimpfungsraten) und ihrer Partner konnte die Anzahl der Masern-Todesfälle weltweit auf ca. 345.000 Fälle im Jahr 2005 gesenkt und insgesamt zwischen 1999 und 2005 etwa 7,5 Mio. Masern-Todesfälle verhindert werden (CDC; Eurosurveillance Weekly, 2007; 12 (1) Jan. 25). Neben Menschen, die das einzige natürliche Reservoir darstellen, kann das MV noch einige Primatenspezies infizieren (Lorenz et al., 1980; Norrby und Oxman, 1990).

Die stärkste Reduktion von Todesfällen wurde in Entwicklungsländern Asiens und Afrikas erreicht. Dennoch gehören zu den Todesopfern insbesondere Kleinkinder in der dritten Welt (Griffin et al., 2001). In vielen Entwicklungsländern ist MV nach wie vor endemisch (Aylward et al., 1997). Oftmals ist die Sterberate eine Konsequenz der allgemeinen Immunsuppression, die durch die Masern-Virusinfektion hervorgerufen wird, wobei meist die Hemmung der Lymphozytenproliferation und eine Reduktion der Lymphozytenzahl um bis zu 50 % (Lymphopenie) diagnostiziert werden (Slifka et al., 2003). Grundlage der hohen Sterblichkeit sind folglich vor allem opportunistische Infektionen, wobei auch der gleichzeitig schlechte Ernährungszustand und die mangelnden hygienischen Bedingungen eine Rolle spielen. Die Immunsuppression hält noch wochenlang an, auch dann noch, wenn die Anzahl der Lymphozyten den normalen Wert wieder erreicht hat und MV infizierte Zellen nicht mehr im Organismus zu finden sind (Okada et al., 2001).

In Industriestaaten stirbt etwa eines von 1.000 mit Masern infizierten und gemeldeten Kindern an dieser Erkrankung. Während durch eine konsequente Impfstrategie auf dem gesamten amerikanischen Kontinent bis zum Jahr 2000 die einheimischen Masern ausgerottet werden konnten, sind in vielen Ländern Europas (Ausnahme Nordeuropa) die Durchimpfungsraten nicht ausreichend hoch (wegen Bedenken der Eltern gegenüber der Impfsicherheit), um die Verbreitung von Wildtypviren zu unterbrechen. Daher sind auch in Europa Masern-Ausbrüche noch immer an der Tagesordnung. In Österreich trat die letzte große Epidemie 1995/1996 auf. Als Folge der damaligen Epidemie erkrankten allein zwischen 1997 und 2007 insgesamt 16 Kinder an einer subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE). Zwischen 2006 bzw. 2007 traten Ausbrüche in Deutschland, Schweiz, Italien, England, der russischen Föderation, Serbien und Spanien auf, wobei der größte Ausbruch mit mehr als 44.000 Fällen in der Ukraine zu verzeichnen war. In Deutschland wurden 2006 mit 2.307 Erkrankungen die meisten Masernfälle in ganz Europa registriert (RKI). In nicht geimpften Populationen brechen die Masern periodisch im Abstand von 2 - 5 Jahren aus. Dieses Zeitintervall verringert sich, wenn die Populationsdichte steigt und der räumliche Abstand der Individuen zueinander abnimmt. In geimpften Populationen mit einer hohen Durchimpfungsrate vergrößert sich der Zeitabstand von Masernausbrüchen. Nur ausreichend hohe Impfniveaus (ca. 95 %) können eine endemische Ausbreitung unterbrechen (Griffin et al., 2008).

Masern sind eine hochfieberhafte Erkrankung, bei der Erwachsene besonders schwer erkranken. Die Inkubationszeit dauert etwa neun bis elf Tage. Zu den ersten Symptomen gehören Bindehautentzündung, Lichtscheue, Husten, Schnupfen und schnell ansteigendes Fieber. Ein markantes Zeichen sind die sogenannten Koplikschen Flecken in der Mundschleimhaut, die von dem New Yorker Arzt Koplik 1896 beschrieben wurden. Bei der akuten MV-Infektion werden zuerst Zellen des respiratorischen Traktes und anschließend der lymphatischen Gewebe infiziert (Schneider-Schaulies et al., 2003; Sips et al., 2007). Es ist allerdings bisher noch ungeklärt, in welchem Zelltyp die anfängliche Replikation stattfindet. Da Epithelzellen den von MV verwendeten CD150-Rezeptor jedoch nicht exprimieren, ist immer noch unklar, ob die aus Lehrbüchern stammende Theorie, dass MV zuerst Epithelzellen des Respirationstraktes infiziert (Tahara et al., 2007), tatsächlich *in vivo* stattfindet (De Swart, 2008; Leonard et al., 2008). Im neueren Modell wird vermutet, dass Epithelzellen nicht über die apikale Oberfläche infiziert werden können, sondern zu späteren Infektionszeitpunkten über die basolaterale Oberfläche durch Kontakte mit darunterliegenden Lymphozyten (Leonard et al., 2008). Nach der Virusvermehrung in den lokalen Lymphknoten kommt es zu einer primären, blutzellassoziierten Virämie. In deren Verlauf breitet sich das MV 10 - 14 Tage nach Infektion mit Hilfe von Monozyten auf verschiedene Gewebe bzw. Organe, wie Leber, Nieren, Gastrointestinaltrakt, Lunge, Thymus und Haut aus, wobei das charakteristische Masern-Exanthem entsteht (Kempe und Fulginiti, 1965). Die Infektion scheint in diesen Geweben vermutlich durch das Eindringen infizierter Makrophagen und Lymphozyten oder durch Infektion der oberen Gewebeschicht hervorgerufen zu werden. Nach 2 - 3 Tagen klingt das Exanthem wieder ab, wobei die symptomatische Phase insgesamt etwa 10 Tage dauert. Dabei scheint MV bevorzugt dendritische Zellen, Monozyten, Makrophagen und Epithelzellen sowie die Endothelzellen der versorgenden Blutgefäße in den verschiedenen Geweben zu infizieren (Griffin et al., 2007).

Komplikationen bei Masern werden durch opportunistische Sekundärinfektionen nekrotisierender Oberflächen, wie z. B. im Respirations- oder Gastrointestinaltrakt hervorgerufen (Review Griffin et al., 2008). Bakterien und andere Viren können eindringen und eine Lungenentzündung oder andere Komplikationen wie Bronchitis und schwere Formen von Diarrhö hervorrufen. Die schwersten Komplikationen, die direkt von MV ausgelöst werden, sind Riesenzellpneumonie und die akute postinfektiöse Masern-Enzephalitis (APME) (ter Meulen et al., 1983; Billeter und Cattaneo, 1991). APME, was in ca. 1 von 1.000 Individuen auftritt, entsteht ca. 5 - 14 Tage nach dem Exanthem und wird als Autoimmunreaktion eventuell gegen das Myelinprotein vermutet (Johnson et al., 1984). Dabei wurde in Untersuchungen kein MV-Antigen im Gehirn gefunden (Johnson et al., 1984).

Außerdem kann als seltene, aber fatale Spätfolge einer persistierenden MV-Infektion mit Beteiligung des zentralen Nervensystems (ZNS) die subakute sklerosierende Panenzephalitis (SSPE) auftreten. Sie stellt eine generelle Entzündung des Gehirns mit einer Demyelinisierung der Nerven dar. Die Erkrankung kann Monate bis Jahre (im Schnitt 7 Jahre) nach einer Maserninfektion auftreten und der Verlauf ist langsam über 1 - 3 Jahre (Hillemann et al., 2001). Dabei verläuft die Krankheit in 3 Stadien, wobei das erste durch psychische Störungen und Demenz gekennzeichnet ist. In der zweiten Phase kommt es vermehrt zu Muskelkrämpfen (Myoklonien) und epileptischen Anfällen. Im dritten Stadium kommt es letztlich zum Dezerebrationssyndrom, bei dem das Großhirn stark geschädigt wird. Die Häufigkeit der SSPE wurde früher mit 5 bis 10 pro 1 Million Masernfällen angegeben. Die neuere Literatur geht jedoch von einer Häufigkeit von etwa 1 : 10.000 Infizierten aus (Bellini et al., 2005; RKI 2006). Die SSPE tritt in den meisten Fällen bei Kindern oder Jugendlichen auf, die vor ihrem zweiten Lebensjahr die Masern durchgemacht haben. Während Schwangerschaften kann eine Maserninfektion zum Abbruch der Schwangerschaft oder zu einer Totgeburt führen. Nachdem der durch maternale Antikörper erworbene passive Schutz langsam nachlässt, entsteht ein lebensbedrohliches Risiko, vor allem im Zeitraum zwischen 9 und 15 Monaten nach der Geburt. Aufgrund der Neutralisation durch maternale Antikörper bei zu früher Verabreichung von attenuierten Lebendimpfstoffen ergibt sich hier ein Gefahrenpunkt. Denn werden diese nicht verabreicht, besteht kein Schutz mehr gegenüber einer MV-Infektion (Garenne et al., 1991; Aaby et al., 1993). Da Kinder erst ab dem 12. Lebensmonat gegen Masern geimpft werden können, sind sie nur geschützt, wenn sie sich aufgrund einer durchgeimpften Umgebung nicht anstecken können.

1992 bzw. 1993 konnte ein mAK isoliert werden, der die Bindung von MV-Laborstämmen an Zielzellen verhindert (Naniche et al., 1993). Nach weiteren Untersuchungen konnte CD46 als Rezeptorkandidat für MV (Dörig et al., 1993) vorgeschlagen werden. Mit Moesin (membrane-organizing extension spike protein) wurde ein Protein beschrieben (Dunster et al., 1994), das ein Mitglied der Familie der Zellmatrixproteine Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) bildet, welches durch die Interaktion mit Aktin der Verankerung des Zytoskeletts dient. Dabei korreliert die Expression gut mit der Infizierbarkeit dieser Zellen durch MV. Die Bedeutung des Moesin bei der Bildung eines funktionellen Rezeptorkomplexes mit dem primären Rezeptor CD46 konnte unter anderem durch Kolkalisierung mit CD46 in der Elektronenmikroskopie belegt werden (Schneider-Schaulies et al., 1995).

Schließlich wurde CD150 (SLAM) als ein Rezeptor sowohl für MV-Impfstämme als auch für Wildtypstämme identifiziert (Tatsuo et al. 2000, Erlenhöfer et al., 2001). Außerdem stellte man in weiteren Untersuchungen fest, dass CDV sowie RPV den für MV identifizierten CD150-Rezeptor (SLAM) ebenfalls nutzen, um sich an die Zelle anzuheften (Baron et al., 2005; Wenzlow et al., 2007). Dabei wird das jeweilige SLAM der entsprechenden Wirtsspezies am effizientesten benutzt. Das humane SLAM ist ein Membranglykoprotein, das selektiv auf den Zellen des Immunsystems exprimiert wird (unreife Thymozyten, aktivierte Lymphozyten, aktivierte Monozyten und gereifte dendritische Zellen). Ferner scheint es die Lymphozytenaktivierung und die Interferon- γ -Produktion zu kontrollieren. Deshalb könnte die Zerstörung bzw. Beeinträchtigung der infizierten SLAM-positiven Zellen einer der Mechanismen für die Immunsuppression sein, die durch Morbilliviren ausgelöst werden (Erlenhöfer, C. et al., 2001; Tatsuo und Yanagi, 2001).

Nach einer MV-Infektion bildet der Wirt generell Antikörper (AK) und baut eine Immunabwehr gegen den Erreger auf, die im Normalfall ein Leben lang gegen eine Neuinfektion mit dem MV schützt.

Das Hundestaupavirus (CDV) verursacht vor allem bei Hunden, Frettchen und Waschbären eine ähnliche, oft tödlich verlaufende systemische Erkrankung wie das MV. 1761 wurden im europäischen Raum die ersten Fälle von Hundestaube in Spanien beschrieben, die sich dann auf alle europäischen Länder ausbreitete. Unter natürlichen Bedingungen kann CDV die unterschiedlichsten im Wasser und an Land lebenden Karnivoren infizieren (Mamaev et al., 1995, 1996), wobei die Letalitätsrate wirtsabhängig bei über 80 % liegen kann. Seit 1988 gibt es zudem Anzeichen für eine weitere Ausbreitung des natürlichen Wirtsspektrums von CDV, beispielsweise bei den Seehunden des Baikalsees (*Phoca sibirica*) (Visser et al., 1990). Auch von CDV-Varianten, die in nordamerikanischen Zoos und Safariparks bei Löwen, Tigern und Jaguaren Staupeerkrankungen verursachten, wurde berichtet. 1994 und 2000 starben im Serengeti Nationalpark (Tansania) und den benachbarten Gebieten 30 % der freilebenden Löwenpopulation sowie unzählige Hyänen bei einer CDV-Seuche (Harder et al., 1995, Morell et al., 1994; van de Bildt, 2002).

Seit Anfang der 50er Jahre sind Lebendimpfstoffe für CDV erhältlich, welche auf CDV-Stämmen basieren, die durch serielle Passagierung in Zellkulturen attenuiert wurden. Die weite Anwendung dieser Impfstoffe führte gerade in den Industrieländern zu einer drastischen Reduzierung von Staube-Epidemien. Allerdings traten immer wieder in Frankreich, Japan, Deutschland, USA und Skandinavien größere Ausbrüche der Hundestaube in Hundepopulationen mit hoher Durchimpfungsrate auf (Blixenkronen-Möller et al., 1993, Gemma et al., 1996; Maes et al., 2003). Möglicherweise ist die Ursache dafür eine antigenische Drift im Wild-Typ des CDV (Harder und Osterhaus, 1997; Calderon et al., 2007). Weiterhin wurden immer wieder CDV-Stämme aus unterschiedlichen Regionen isoliert und analysiert, wobei besonders Veränderungen in den Oberflächenproteinen beobachtet wurden (Chan et al., 2008; Pardo et al., 2005; Kapil et al., 2008; Iwatsuki et al., 2000), was zum Verlust der Wirksamkeit von Impfstoffen führen kann.

CDV ist ein hochansteckendes Virus, das wie MV durch Aerosole oder Tröpfcheninfektion übertragen wird und typische Symptome wie Pneumonie, Nasenschleimhautentzündung, Konjunktivitis, Fieber und Gastroenteritis hervorruft. Es gelangt vermutlich ähnlich wie MV über die Atemwege in den Körper und infiziert primär pulmonale dendritische Zellen (Ludlow, unpublished). Anschließend werden wohl die bronchialen Lymphknoten und die Mandeln infiziert. In der ersten Woche nach der Infektion folgt gewöhnlich eine blutzellassoziierte Virämie, wie dies auch bei MV beobachtet wird. Als Folge breitet sich CDV schnell im Körper

aus und infiziert weitere Organe, wie Milz, Knochenmark, Thymus und Lymphknoten (Appel und Gillespie, 1972).

Durch die Infektion von Endothelzellen der Blut-Hirn-Schranke (Axthelm und Krakowa, 1987) oder durch den Transport via infizierter Monozyten (Appel et al., 1969) gelangt das Hundestaupe-Virus in das zentrale Nervensystem (ZNS), weshalb es sich bei vielen erkrankten Tieren auch im Gehirn nachweisen lässt. Somit ist CDV deutlich neurotroper als das Masern-Virus. Daher ist die häufigste Todesursache bei den erkrankten Hunden die Enzephalomyelitis. Sie äußert sich durch das Auftreten von Einschlusskörperchen in Gliazellen und Neuronen sowie einer Demyelinisierung. Dabei ist sie der durch MV verursachten subakuten sklerosierenden Panenzephalitis (SSPE) ähnlich. Ferner verursacht CDV genauso wie MV eine Lymphopenie, die mit einer lang anhaltenden Immunsuppression assoziiert ist. Daher ist das Auftreten opportunistischer Infektionen (Munson et al., 2008; Krakowa et al., 1980, ter Meulen et al., 1982) oft auch Ursache der Letalität bei CDV.

Beim Hundestaupe-Virus gibt es drei verschiedene Krankheitsbilder - die systemische Infektion, die kombinierte systemische und zentralnervöse Form sowie die überwiegend zentralnervöse Form. Besonders bei älteren Hunden oder bei Tieren, die immunisiert wurden, tritt ein Krankheitsbild auf, das als „Old dog encephalitis“ (ODE) oder „subakute diffuse sklerosierende Enzephalomyelitis“ bezeichnet wird und auf einer CDV-Infektion des ZNS basiert (van Bogaet und Innes, 1962).

Hunde, die ca. 10 - 14 Tage nach Infektion als Folge der humoralen Immunantwort hohe Titer neutralisierender Antikörper gegen die Oberflächenproteine und das Nukleoprotein entwickeln (ca. 50 % der Hunde) überleben die Staupe-Infektion und haben normalerweise eine lang anhaltende Immunität (Miele und Krakowka, 1983, Rima et al., 1991). Bei neugeborenen Hunden liegt ein maternaler Antikörperschutz vor, wie dies auch bei MV der Fall ist. Allerdings scheint durch die maternale Antikörperantwort keine Kreuzreaktion bzw. Neutralisierung mit der Vakzine ausgelöst zu werden, da 7 - 9 Wochen alte Babys mit maternaler Immunität gegen CDV nach einer CDV-Impfung trotzdem gegen eine intravenös injizierte CDV-Dosis geschützt bleiben (Pardo et al., 2007).

Eine nicht ausreichende Produktion an schützenden Antikörpern lässt eine massive Infektion des ZNS zu und die Individuen sterben nach 3 - 4 Wochen (Appel und Gillespie, 1972). Antivirale H-Protein-AK vermeiden generell die Entwicklung von ZNS-Läsionen (Rima et al., 1991). Überleben Hunde trotz nicht ausreichender Antikörperantwort, liegt CDV meist in persistierender Form in epidermalen Zellen oder Neuronen vor. Diese Viruspersistenz in Zellen der Pfotenballen oder des Gehirns ist Ursache für die sogenannte „Hard pad disease“ bzw. ODE (Miele und Krakowka, 1983).

Als zellulärer Rezeptor des Hundestaupevirus (CDV) ist zurzeit nur CD150 bekannt (Tatsuo et al., 2001); es spielen aber vermutlich auch andere Moleküle eine Rolle. Genetische Untersuchungen mit Human-Maus-Zellhybriden legen nahe, dass das humane Chromosom 19 auch für einen CDV-Rezeptor kodiert (Stern et al., 1995). Dabei bildeten zwei von 12 getesteten hybriden Zelllinien nach Infektion mit CDV Synzytien. Diese beiden Hybride enthielten als einzige, neben anderen humanen Chromosomen, das Chromosom 19, weshalb angenommen wird, dass es ein Gen für ein CDV-Rezeptorprotein trägt. 1997 wurde ein monoklonaler Antikörper (mAK K41) isoliert, der an der Zelloberfläche bindet und somit die CDV-Infektion verschiedener Zelllinien inhibiert (Löffler et al., 1997). Auf Zelllinien verschiedener Spezies wurde die Expression des erkannten Moleküls im Durchflußzytometer gemessen und die Infizierbarkeit mit CDV sowie die Inhibierung der Infektion (Plaquebildung) durch mAK K41 damit verglichen. Bei K41-positiven Zellen von Mensch, Affe, Hund, Katze, Kaninchen und Waschbär konnte durch die Vorbehandlung der Zellen mit mAK K41 sowohl die Anzahl der durch CDV entstehenden infizierten Zentren, als auch die Größe der entstehenden Synzytien reduziert werden (Löffler et al., 1997). Mittels Affinitätschromatographie mit an Sepharose gekoppeltem mAK K41 wurde ein 26 kDa Protein aus der Vero-Zellmembran gereinigt und dieses schließlich als CD9-Molekül identifiziert. CD9 ist ein Mitglied der Transmembran-4-Protein-Superfamilie (TM4SF) und ist als integrales Membranprotein auf der Oberfläche vieler Zelllinien zu finden. In weiteren Untersuchungen konnte allerdings keine direkte Bindung von CDV an CD9 nachgewiesen werden und somit schien CD9 nur als Kofaktor eine Rolle in der CDV-Infektion zu spielen (Löffler et al., 1997). Weiterhin stellte sich heraus, dass der mAK K41 weder auf die Virusbindung, die Transkription viraler RNA, die Biosynthese der viralen Proteine, noch auf das Budding und somit das Entlassen

des Virus aus der Zelle Auswirkungen hatte. Hingegen wurde für die Synzytien-bildenden CDV-Stämme das Entlassen des Virus, die Virus-induzierte Zell-Zellfusion in lytisch infizierten Kulturen und die Zell-Zellfusion von uninfizierten mit persistent CDV-infizierten HeLa-Zellen stark durch mAK K41 inhibiert. Somit zeigte sich, dass anti-CD9 Antikörper selektiv die Virus-induzierte Zell-Zellfusion blockieren, während die Virus-Zellfusion davon nicht betroffen ist (Schmid et al., 2000).

Das Nipah-Virus (NiV) wurde 1999 erstmalig charakterisiert (Lim et al., 1999), nachdem der Ausbruch einer infektiösen Enzephalitis in Malaysia und Singapur untersucht wurde. Das isolierte Virus ähnelte morphologisch dem kurz zuvor in Australien entdeckten Hendra-Virus (HeV), unterschied sich jedoch in Krankheitsverlauf und Antigenität (Centers for Disease Control and Prevention (CDC), 1999; Chua et al., 2000; Wang et al., 2000). Es wurde daher zunächst als Hendra-like Virus bezeichnet. Erst später erhielt das Virus seinen taxonomischen Namen durch den Ort Kampung Sungai Nipah auf der malayischen Insel Pangkor, wo die Epidemie von 1998 besonders hohe Infektionszahlen aufwies und das Virus aus einem von dort stammenden Patienten isoliert wurde. Es gehört zu den sogenannten „emerging viruses“.

Das ökologische Reservoir des Nipah-Virus sind Flughunde der Gattung Pteropus, die besonders in Australien und Südostasien (Malaysia, Kambodscha) vorkommen und keinerlei Krankheitssymptome zeigen (Yob et al., 2001). Erst kürzlich konnte im Urin der Spezies Pteropus lylei aus Thailand sowie anderer Spezies aus Kambodscha und Madagaskar auch der Erreger direkt nachgewiesen werden (Wacharapluesadee et al., 2005, 2006; lehlé et al., 2007; Reynes et al., 2005). Diese Flughunde sind vermutlich für einige lokal begrenzte Ausbrüche bei Haustieren (besonders bei Pferden und Schweinen) und Menschen verantwortlich, auf die sie durch Tröpfcheninfektion oder Einatmen von urinhaltigen Aerosolen übertragen wurden (Chua et al., 2000).

Die Infektion verursacht beim Menschen eine hohe Sterblichkeitsrate, da die Nipah- und Hendra-Viren neben einer Lungenentzündung auch eine Enzephalitis hervorrufen können. Zwischen September 1998 und April 1999 wurden offiziell 229 Fälle einer schwerverlaufenden, fiebrigen Enzephalitis in Malaysia gemeldet und kurz nach Beginn dieser Epidemie neun Fälle in Singapur. Hier wurde auch von Symptomen einer schweren Infektion der Atemwege berichtet. Überwiegend waren Männer betroffen, die in Schlachthäusern arbeiteten und mit Schweinetransporten zu tun hatten, wobei 48 % der Erkrankten starben (CDC, 1999). Daher vermutete man sehr schnell einen Zusammenhang mit einer Infektion bei Tieren. Gleichzeitig wurde in Malaysia bei Schweinen ein milder Ausbruch einer fiebrigen Atemwegsinfektion mit ungeklärtem Erreger registriert, der erst später als der gleiche Erreger wie bei den Enzephalitis-Patienten identifiziert wurde. Nach überstandener Infektion scheinen die Schweine gegenüber einer erneuten Infektion immun zu sein. Ein entsprechender Impfstoff für Schweine wurde bereits entwickelt (Weingartl et al., 2006), dieser jedoch noch nicht produziert oder zugelassen. Um die weitere Verbreitung der Epidemie auch beim Menschen zu verhindern, wurde der Schweinebestand drastisch reduziert (etwa die Hälfte des gesamten malaysischen Schweinebestandes) und die veterinärmedizinische Überwachung ausgeweitet. Rückwirkende Untersuchungen deuten darauf hin, dass das NiV seit 1996 für Krankheitsausbrüche bei Schweinen in Malaysia verantwortlich war, dann über Viehtransporte in die Südspitze der Halbinsel und bis nach Singapur gelangte (Aziz et al., 1999; Wong et al., 2002).

In Schweinen verursacht NiV eine hochkontagiöse akute Atemwegsinfektion („Brüllhusten“) mit geringer Mortalität, aber hoher Morbidität (Chua et al., 2000; Mohd Nor et al., 2000). Sie infizieren sich möglicherweise über den Kontakt mit Ausscheidungen oder angefressenen Früchten der Fledermäuse, und übertragen das Virus dann über Aerosole oder direkten Kontakt auf Menschen oder Hunde und Katzen (Anonymous et al., 1999a, b; Chua et al., 2000). Der Ausbruch in Malaysia war vermutlich die Folge von menschlichen Eingriffen in die ökologische Nische der Fledermäuse. Da der Lebensraum der Fledermäuse immer stärker eingeschränkt wurde, führte dies wohl dazu, dass Mensch und Tier in enger Nachbarschaft miteinander lebten. Nach dem Übergang des Virus auf Schweine bot die Masthaltung auf engem Raum optimale Bedingungen für die weitere Virusausbreitung (Field et al., 2001).

Die Übertragung von Mensch zu Mensch scheint schwieriger zu sein, da nur knapp die Hälfte der 1998 erkrankten Arbeiter eine Person in familiärer Umgebung infizierten (Wong et al., 2003). 2002 kam es in

Nordindien sowie zwischen 2001 und 2005 in Bangladesch zu erneuten NiV-Ausbrüchen (Butler, 2004; Chadha et al., 2006; Hsu et al., 2004). In Bangladesch wurde das Virus direkt von infizierten Fledermäusen auf den Mensch übertragen, da Schweine weder Krankheitssymptome zeigten noch als Zwischenwirt nachgewiesen werden konnten. Hierbei betrug die Mortalitätsrate über 60 % und es konnten einige wenige Mensch-zu-Mensch-Übertragungen beobachtet werden (Choi, 2004; Anonymous, 2004).

Die Erkrankung beim Menschen beginnt nach einer Inkubationszeit von weniger als zwei Wochen mit Fieber, Kopfschmerzen und Schwindel-Symptome einer akuten Enzephalitis. Bei 75 % der Patienten zeigen sich sehr früh Befunde einer viralen Infektion in der Gehirn-Rückenmarks-Flüssigkeit. Weitere klinische Anzeichen der Erkrankung sind neben eingeschränktem Bewusstsein oft unwillkürliche Muskelzuckungen, erhöhter Puls, Areflexie, Hypotonie und Hypertension (Wong et al., 2002). Vermutlich sind die beobachteten neurologischen Dysfunktionen die Folge von fokalen Infarkten im Gehirn, die hauptsächlich auf die lytische Infektion des Hirndothels zurückzuführen sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass das NiV die Blut-Hirn-Schranke überwinden kann und somit neurologische Schäden eine Folge der direkten Infektion von Neuronen sein könnten (Chua et al., 1999; Paton et al., 1999). Bereits innerhalb von 24 bis 48 Stunden werden die Patienten komatös und etwa 60 % der bislang beschriebenen Erkrankungen verliefen tödlich. Neben der akuten Erkrankung entwickelt sich bei 7,5 % der Erkrankten als Spätkomplikation eine Enzephalitis oder bei symptomlosen Patienten erst nach Monaten eine fokal begrenzte Enzephalitis (3,4 %) (late-onset Enzephalitiden), was für eine Viruspersistenz im ZNS spricht (Wong et al. 2002). Die Zeitspanne zwischen akuter Erkrankung und Spätkomplikation betrug bisher im Schnitt 8,4 Monate. Dauerhafte Schäden wie chronisches Anfallsleiden (Epilepsie) und Persönlichkeitsveränderung nach überstandener Infektion sind beschrieben.

Die Virusausbreitung stellt man sich wie folgt vor (Wong et al., 2002): Nach aerogener Übertragung des NiV findet vermutlich eine erste Virusreplikation im Respirationstrakt statt, wobei anschließend die systemische Infektion von Endothelzellen kleiner Gefäße, die im ZNS am stärksten ausgeprägt ist, erfolgt. Nachfolgend werden Lunge, Herz und Nieren infiziert, wobei die Leber nicht betroffen zu sein scheint. Dabei kann eine virusinduzierte Fusion von Endothelzellen, die zur Bildung mehrkerniger Synzytien führt, beobachtet werden. Diese lösen sich gelegentlich aus dem Zellverband und gelangen so ins Gefäßlumen, wo sie Thrombosen verursachen können. Zusätzlich können neben den Gefäßentzündungen lytische Nekrosen (Plaques) im zerebralen Kortex und im Hirnstamm detektiert werden (Chua et al., 2000).

Die zellulären Rezeptoren des Nipah-Virus wurden 2005 entschlüsselt. Hierbei konnte man Ephrin B2, ein membrangebundener Ligand der Rezeptor Tyrosin Kinasen (RTKs), die zur EphB Klasse gehören, als zellulären Rezeptor für NiV und HeV identifizieren. Dieser kann im Gegensatz zu Ephrin B1 spezifisch von dem NiV G-Protein gebunden werden (Negrete et al., 2005). Ephrin B2 wird auf Endothelzellen und Neuronen exprimiert, was mit dem Infektionstropismus von NiV einhergeht (Gale et al., 2001). Außerdem konnte im folgenden Jahr Ephrin B3 als alternativer Rezeptor identifiziert werden (Negrete et al., 2006).

1.2 Biologie der Morbilliviren MV, CDV sowie des Henipavirus NiV

1.2.1 Taxonomie

Morbilliviren besitzen, wie alle Mitglieder der Paramyxoviridae, eine einzelsträngige, durchgängige RNA negativer Polarität. Aufgrund von Sequenzhomologien der viralen Nukleinsäuren und Proteine konnten den Paramyxovirinae bisher folgende Mitglieder zugeordnet werden: das Hundestaupavirus (CDV), das Masern-Virus (MV), das Rinderpest-Virus (RPV), das „Peste des petits ruminants“-Virus (PPRV), das Seehundstaupavirus (PDV-1 und PDV-2) und das Delphin- und Tümmler-Morbillivirus (DMV und PMV) (Barrett et al., 2002; Visser et al., 1993; Murphy et al., 1995). Außerdem wurden weitere Morbilliviren beschrieben, so z. B. 1998 in Tupajas und Walen (Tidona et al., 1998; Jauniaux et al., 1998)(siehe Tabelle 1.2.1.1). Die Morbilliviren besitzen Hämagglutinin-, Neuraminidase- und hämolytische Aktivität, wurden aber früher wegen der angeblich fehlenden Neuraminidaseaktivität ursprünglich von den anderen Genera der Unterfamilie der Paramyxovirinae

abgetrennt. Allerdings wurde 1997 aufgrund von dreidimensionalen Strukturmodellen auch für die Hämagglutinin-Proteine eine Neuraminidaseaktivität beschrieben. Dies konnte experimentell für RPV und das „Peste des petits ruminants“-Virus bestätigt werden (Langendijk et al., 1997). Die zweite Unterfamilie wird von den Pneumovirinae gebildet, denen das Meta- und das Pneumovirus untergeordnet sind.

Das Nipah-Virus (NiV) bildet innerhalb der Paramyxovirinae zusammen mit dem Hendravirus (HeV) den Genus der Henipaviren (Wang et al., 2000). Auch sie sind umhüllte Viren mit einem nichtsegmentierten, einzelsträngigen RNA-Genom in negativer Orientierung.

Auf Grund dieser Charakteristika werden sie gemeinsam mit den Borna-, Filo- und Rhabdoviren zur Ordnung der Mononegavirales zusammengefasst (Murphy et al., 1995).

Unterfamilie	Genus	Mensch	Tier
Paramyxovirinae	Respiovirus <i>Neuraminidase;</i> <i>verursacht Hämagglutination;</i>	Humanes Parainfluenzavirus (HPIV) 1, 3	Sendai-Virus (SV); Bovines Parainfluenzavirus (PI 3)
	Rubulavirus <i>Neuraminidase;</i> <i>verursacht Hämagglutination;</i>	Mumpsvirus (MuV) Humanes Parainfluenzavirus (HPIV) 2, 4	Porcine Rubula-Virus; Simian Virus 5, 41 (SV5, SV 41)
	Morbillivirus <i>keine Neuraminidase;</i> <i>verursacht Hämagglutination;</i>	Masernvirus (MV)	Hundestaupe (CDV); Rinderpest (RPV); Peste des petites ruminants (PPRV) ; Seehundstaupe (PDV)
	Henipavirus <i>Keine Hämagglutination;</i> <i>keine Neuraminidase;</i>	Hendra-Virus (HeV) Nipah-Virus (NiV)	Hendra-Virus (Pferde; Fruchtfledermäuse); Nipah-Virus (Schweine; Fledermäuse)
	Avulavirus <i>Neuraminidase verursacht Hämagglutination;</i>		Newcastle disease virus (NDV); Avian Paramyxovirus (APMV) 2 - 9
Pneumovirinae	Pneumovirus <i>Keine Hämagglutination;</i> <i>keine Neuraminidase;</i>	Humanes Respiratorisches Syncytialvirus (HRSV)	Bovines Respiratorisches Syncytialvirus (BRSV)
	Metapneumovirus <i>Keine Hämagglutination;</i> <i>keine Neuraminidase;</i>	Humanes Metapneumovirus (HMPV)	

Tabelle 1.2.1.1: Charakteristische Vertreter der Paramyxoviridae.

1.2.2 Morphologie

Da CDV und MV sehr eng miteinander verwandt sind, sind sich die Viruspartikel in ihrer Struktur und genomisch sehr ähnlich. Die pleomorphen Virionen sind 100 - 300 nm lang und haben einen Durchmesser von etwa 100 - 200 nm. Es wurden sowohl filamentöse als auch irreguläre Formen beschrieben, die alle von einer Lipidmembran umhüllt sind. Insgesamt 6 Strukturproteine sind im Virion vorhanden, wovon zwei das Rezeptorbindende Hämagglutinin (H) und das Fusionsprotein (F) darstellen. Sie sind in die Lipidhülle, die aus der Zytoplasmamembran der infizierten Zelle entsteht, eingelagert. Sie bilden Multimere, die ca. 9 - 15 nm aus der



Membran herausragen und formen gemeinsam die sogenannten Spikes, die elektronenmikroskopisch sichtbar gemacht werden können (siehe Abbildung 1.2.2.1).

Abbildung 1.2.2.1: Trans-Elektronenmikroskopische Aufnahme eines einzelnen Masernpartikels. Die aus den Hämagglutinations (H)- und Fusions (F)-Proteinen geformten Spikes sind deutlich zu erkennen (Centers for Disease Control and Prevention's Public Health Image Library (PHIL), identification number #8429).

Die Virionen werden weiterhin durch einen Ribonukleoprotein-Komplex (RNP), der von der viralen Lipidhülle (Envelope) umgeben ist, gebildet. Auf der Innenseite der viralen Hülle befindet sich das Matrixprotein (M), das als Bindeglied zwischen der viralen Hülle und RNP dient. Der RNP ist eine replikationskompetente Einheit und wird aus dem helikal angeordneten, einzelsträngigen RNA-Genom gebildet, das mit dem Nukleokapsidprotein (N), dem Phosphoprotein (P) und dem Large-Protein (L) (RNA-abhängigen RNA-Polymerase) assoziiert ist (siehe Abbildung 1.2.2.2).

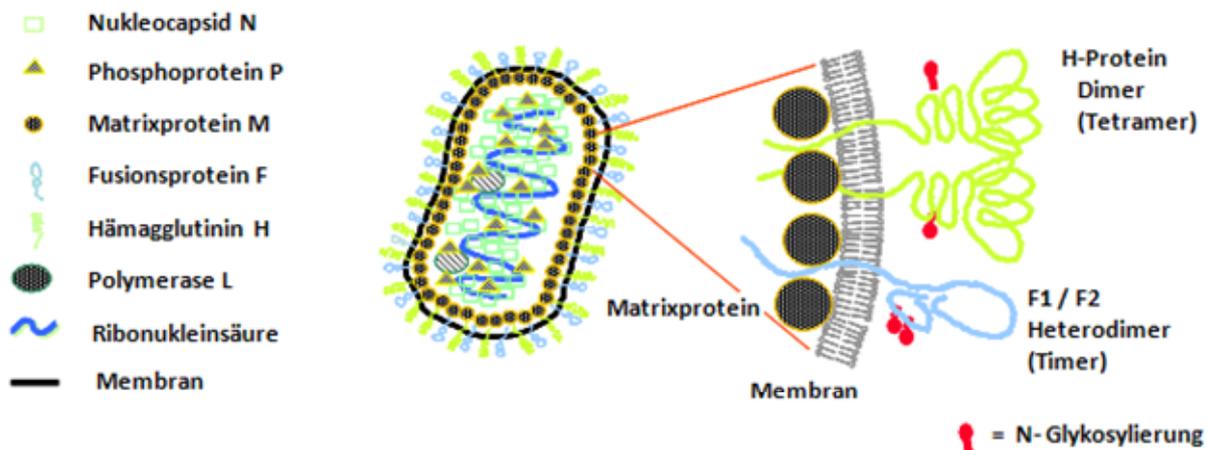


Abbildung 1.2.2.2: Schematischer Aufbau eines Morbillivirus-Partikels.

Das Nipah-Virus unterscheidet sich von anderen Mitgliedern der Paramyxoviridae besonders durch ein um etwa 3000 nt längeres Genom (Wang et al., 2000). Die Viren besitzen anstatt des Hämagglutinin-Proteins (H) ein rezeptorbindendes Glykoprotein (G) zur Erkennung der Zielzelle, das im Gegensatz zu den meisten Paramyxoviren keine Hämagglutinin- oder Neuraminidase-Aktivität besitzt. Die Viruspartikel sind ebenfalls pleomorph und zwischen 40 und 600 nm (Hyatt et al., 2001) groß (siehe Abbildung 1.2.2.3). Ferner entsprechen die Morphologie und der Aufbau von NiV Partikeln den für Morbilliviren beschriebenen.



Abbildung 1.2.2.3: Elektronenmikroskopische Aufnahme pleomorpher Nipah-Viruspartikel (aus Goldsmith et al., 2003).

1.2.3 Genomaufbau

Das Genom von Morbilliviren hat eine Länge von ca. 16.000 Basenpaaren, ist nicht segmentiert und besitzt negative Polarität. Daher kann das Genom nicht direkt als mRNA wirken und ist somit nicht infektiös. Es ist vollständig mit dem N-Protein komplexiert und verpackt, was wohl verhindert, dass bei den Mononegavirales Genomrekombinationen stattfinden können. Dabei enkapsidiert ein Nukleoprotein-Monomer jeweils sechs Nukleotide, was essentiell für die erfolgreiche Replikation zu sein scheint, da die Aktivität des Promotors am 3'-Ende des Genoms von der relativen Lage zu den N-Monomeren abhängt (Calain und Roux, 1993; Halpin et al., 2004; Vulliamoz und Roux, 2001). Wenn diese „Rule of six“ eingehalten wird, tolerieren die Viren Veränderungen ihrer Genomlänge, welche z. B. durch die Einklonierung von Transgenen (eGFP) entstehen (Schneider et al., 2000).

Am 3'-Ende des Genoms ist eine als *Leader* bezeichnete Sequenzfolge von 52 - 54 Basen zu finden, die nicht für Aminosäuren kodiert. Am 5'-Ende befindet sich ein als *Trailer* bezeichneter, nichttranskribierter Bereich, in dem die cis-aktiven Initiationsignale für den Start der Synthese neuer Genomstränge während der Virusreplikation liegen. Nach der *Leader*-Sequenz folgen die sechs nicht überlappenden viralen Strukturgene, in der Reihenfolge 3'- N - P - M - F - H - L -5' (Abbildung 1.2.3.1). Durch eine Leserasterverschiebung im P-Gen ist es möglich, dass einige Morbilliviren noch zwei weitere nicht strukturelle Proteine exprimieren, das C- und das V-Protein, deren Aktivitäten gegen die angeborene Immunantwort des Wirtes gerichtet sind (Bellini et al., 1985). Die *Leader*-Sequenz dient der Anlagerung des Polymerasekomplexes und ist damit für die Initiation der Transkription verantwortlich. Der darin enthaltene Promotor wird von der Polymerase erkannt, die Synthese beginnt und eine kurze RNA-*Leader*-Sequenz entsteht. Danach wird die Transkription wieder aufgenommen und die Polymerase bewegt sich weiter bis zum Anfang des N-Gens, um mit der Polymerisation zu beginnen. Zwischen den proteinkodierenden Sequenzen befinden sich jeweils kurze intergenische Sequenzen, die nicht für Proteine kodieren und an denen es zur Termination der Transkription kommen kann. Je weiter ein Protein vom 3'-Ende entfernt ist, desto höher ist die Wahrscheinlichkeit einer verfrühten Termination. Insgesamt entsteht dadurch ein Gradient der Transkriptionskopienzahl (siehe Abbildung 1.2.3.1) von 3'- in 5'-Richtung des viralen Genoms. Dies führt folglich nach der Translation zu einer großen Menge des strukturell benötigten N-Proteins (zur Enkapsidierung des Genoms) und einer sehr geringen Menge des L-Proteins (Cattaneo et al., 1987; Schneider-Schaulies et al., 1990, Harder und Osterhaus, 1997). Die neu synthetisierten viralen Hüllproteine werden in die Membran infizierter Zellen integriert, dort angehäuft und bilden schließlich neue Viruspartikel (Knospung).

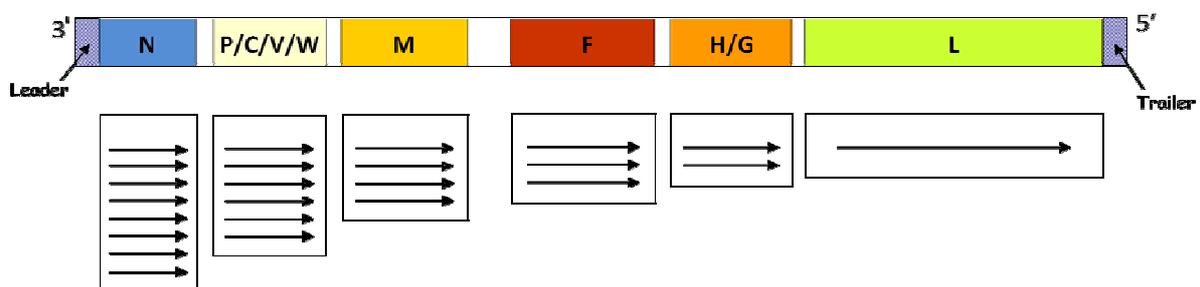


Abbildung 1.2.3.1: Schematische Darstellung des Genoms und der Transkriptionsstrategie der Paramyxoviren. Das Genom beginnt mit einer *Leader*-Sequenz am 3'-Ende und endet mit einer *Trailer*-Sequenz am 5'-Ende. Zwischen den Genen für die Strukturproteine (bunt) liegen die nichtkodierenden Regionen (weiße Balken). Die Pfeile geben den Transkriptionsgradienten wieder.

NiV besitzt ebenfalls ein nichtsegmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom in negativer Orientierung. Die Länge unterscheidet sich jedoch beträchtlich von dem der Morbilliviren, denn es beträgt 18.246 Basen. Somit stellen

NiV die uniforme Genomgröße der Paramyxovirinae in Frage (Pringle, 1991; Rima et al., 1995). Interessanterweise ist die Größe der sechs NiV-Strukturproteine, mit Ausnahme des P-Proteins, welches etwa 100 Nukleotide länger ist als andere P-Proteine, denen der anderen Paramyxovirinae sehr ähnlich. Daher sind die längeren untranslatierten Regionen (UTR) am 3'-Ende verschiedener Gene die Ursache für den Größenzuwachs des Genoms (Harcourt et al., 2001, 2000; Wang et al., 2000).

Die Genomorganisation des NiV entspricht der der übrigen Paramyxoviridae (siehe Abbildung 1.2.3.1). Nach einer nichtkodierenden *Leader*-Sequenz am 3'-Ende, folgen die kodierenden Bereiche für die Gene 3'-N-P-M-F-G-L-5', ebenfalls unterbrochen von nichtkodierenden intergenischen Sequenzen. Am 5'-Ende findet man eine 29 Nukleotide lange *Trailer*-Sequenz mit Signalen zur Verpackung der RNA in die Viruspartikel beim Assembly. Die 3'-*Leader*-Sequenz enthält den Promotor für die Synthese von Positiv-Strang-RNA und die 5'-*Trailer*-Sequenz den Promotor für die Synthese von Negativ-Strang-RNA. Die intergenischen Regionen der Henipaviren sind mit der zwischen allen Transkriptionseinheiten zu findenden Sequenz GAA absolut konserviert (Wang et al., 2000).

1.2.4 Funktion der Paramyxovirus-Hüllproteine

Der Hüllkomplex der Paramyxoviren ist absolut essentiell für die Virusanlagerung und die Fusion mit der Wirtszelle. Er besteht aus zwei integralen Membranproteinen, dem Hämagglutininprotein (H) und Fusionsprotein (F), sowie dem Matrixprotein (M), einem membranassoziierten Protein (Wild et al., 1995).

Das **Matrixprotein** (M, 37 kDa bei MV) lagert sich aufgrund seiner hydrophoben Eigenschaften als Matrixschicht auf der Innenseite der Zytoplasmamembran an. In seiner Sequenz lässt sich weder ein Signalpeptid noch eine Transmembrandomäne identifizieren. Da es einen hohen Anteil an den Aminosäuren Lysin und Arginin hat und daher stark geladen ist, kann es so vermutlich über ionische Wechselwirkungen mit den Phospholipiden an zelluläre Membranen binden. Es interagiert einerseits mit den beiden viralen Glykoproteinen H und F, wechselwirkt aber andererseits auch mit dem N-Protein (Bellini et al., 1994). Das Matrixprotein sorgt so für eine Verknüpfung von RNP-Komplex und der zukünftigen viralen Hülle. Diese Verbindung spielt eine zentrale Rolle für das „Assembly“ und die Knospung (Budding) neuer Viruspartikel. Deshalb wird auch vermutet, dass die Etablierung persistenter CDV-Infektionen auf Mutationen im Matrixprotein zurückzuführen sind (Stettler et al., 1997). Bei Sequenzierungen von SSPE-Präparaten wurden häufig Hypermutationen im M gefunden, die mit einer reduzierten Knospung des Virus korrelieren und die Etablierung einer persistierenden Infektion zu begünstigen scheinen. Rekombinante Masernviren, deren M-Gen deletiert wurde, produzieren kaum neue Viren und unterstützen damit die These, dass das M-Protein für diesen Prozess notwendig ist (Cathomen et al., 1998). Außerdem spielt es eine essentielle Rolle beim Budding (Tyrrell et al., 1979) sowie in der Transkriptionsregulation (Suryanarayana et al., 1994). Andererseits scheint das M-Protein auch ein negativer Regulator der Polymeraseaktivität zu sein, da die Verwendung von M-siRNA die Zell-Zellfusion stimuliert und auch das Niveau der mRNA sowie der genomischen RNA stark erhöht (Reuter et al., 2006).

Das NiV-Matrixprotein (M) besteht aus 352 Aminosäuren und hat ein Molekulargewicht von etwa 40 kDa (Harcourt et al., 2000). So wie andere Paramyxoviren kann das NiV-M mit sich selbst interagieren, also Oligomere bilden, und die Freisetzung von virusähnlichen Partikeln (VLPs) induzieren, wobei diese Fähigkeit von einer potentiellen „Late domain“ abhängig ist (Ciancanelli und Basler, 2006). Vermutlich bindet das NiV-M, wie andere Matrixproteine, gleichzeitig an die zytoplasmatischen Domänen der Glykoproteine sowie die Nukleokapside, vermittelt dadurch den Zusammenbau viraler Partikel an der Plasmamembran und ermöglicht so die Freisetzung der Virionen (Takimota und Portner, 2004).

Das **Fusionsprotein** (F) hat die Funktion nach der Adsorption der Partikel an die Zelle, die pH-unabhängige Verschmelzung der viralen Hülle mit der Zytoplasmamembran der Zielzelle durch seinen heterodimeren Komplex aus F₁- und F₂-Teilen zu induzieren (Epan, 2003; Lamb und Kolakofsky, 2001). Es besitzt sehr stark konservierte Sequenzen und wird als Typ-I-Transmembranprotein (TM) in Form des inaktiven Vorläuferproteins

F_0 (59 kDa bei MV; 60 kDa bei NiV) im Endoplasmatischen Retikulum (ER) synthetisiert und glykosyliert. Alle Typ-I-Proteine werden als Monomere synthetisiert, aber nach dem kotranslationalen Eindringen in die ER-Membran, der Glykosylierung und Faltung trimerisiert (von Messling et al., 2004). Es besitzt daher auch ein typisches Signalpeptid für den Transport zur Membran des ER. Nach dem Durchschleusen der Aminosäurekette durch die Membran bewirkt eine hydrophobe Sequenzfolge am carboxyterminalen Ende die Verankerung des F_0 -Proteins in der Membran und das Signalpeptid wird abgespalten. Das F_0 -Protein wird im Verlauf des Transportes durch den Golgi-Apparat glykosyliert und an argininreichen Spaltstellen durch eine im Golgi-Apparat lokalisierte Protease (Furin) in die zwei funktionellen Untereinheiten F_1 (40 kDa bei MV) und F_2 (18 kDa bei MV) gespalten. Die Spaltstelle liegt zwischen einem Abschnitt basischer Aminosäuren und einer hydrophoben Domäne, wobei durch die Spaltung das aminoterminal Ende des membranverankerten F_1 -Proteins entsteht. Die Untereinheiten F_1 und F_2 bleiben über eine Disulfidbrücke als Heterodimer verbunden (Klenk und Garten, 1994; Scheid und Choppin, 1974). Durch die Spaltung wird das sogenannte Fusionspeptid, ein stark konservierter, hydrophober Bereich von 25 AS, am Aminoterminal der Ektodomäne des F_1 -Proteins exponiert (Epanand et al., 2003; Lamb, 1993). Neben dem Fusionspeptid enthält die F_1 -Untereinheit zwei α -helikale Domänen, die auch als Heptad-repeat-Regionen bezeichnet werden, wobei das Heptad-repeat-1 (HR1 oder HRA) proximal des Fusionspeptids liegt und Heptad-repeat-2 (HR2 oder HRB) der Transmembrandomäne vorausgeht (Luque und Russell, 2007; Xu et al., 2004). So wird vermutlich das hydrophobische Fusionspeptid in die Zellmembran inseriert und bildet eine coiled-coil Haarnadelschleifenstruktur aus sechs Helices mit Hilfe der HRA und HRB Regionen (Lamb et al., 2006; Russell und Luque, 2006), um die Membranfusion aktiv zu steuern (Russell et al., 2001). Diese coiled-coil Struktur klappt dann nach außen weg, der enge Kontakt führt zur Überwindung von Hydratisierungskräften, die eine energetische Barriere darstellen, und die Membranen verschmelzen (Dutch et al., 2000; Earp et al., 2005; Xu et al., 2004). Die anschließende Bildung einer Fusionspore ermöglicht das Entlassen der negativsträngigen RNA ins Zytoplasma (Hernandez et al., 1996). Das F-Protein kann somit im Verlauf eines neuen Infektions- und Adsorptionsvorganges die Verschmelzung der viralen mit der zellulären Membran vermitteln, allerdings nur, wenn das H-Protein den Kontakt mit dem Zellrezeptor herstellt und somit dem F-Protein ein Signal übermittelt, damit die Fusion beginnen kann (Russell et al., 2001; Takimoto et al., 2002). Das F_2 -Protein enthält vier N-Glykosylierungsstellen, die für die Reifung und Funktion des Proteins notwendig sind. Die F-Proteine werden schließlich als Trimere an der Oberfläche infizierter Zellen und in die Zytoplasmamembran eingelagert – so auch bei NiV (Eaton et al., 2004).

Mit Hilfe von Röntgenstrukturanalysen konnte 2006 die Struktur des sehr dem Masern-Virus ähnelnden Fusionsproteins des Parainfluenzavirus 5 (PIV5) und dessen Pre-Fusionszustände aufgeklärt werden (Yin et al., 2006): Dabei erinnert die Konformation des F-Proteins vor der Fusion an ein pilzförmiges Gebilde, bestehend aus einem kugelförmigen Kopf und einer Stiel-ähnlichen Region (siehe Abbildung 1.2.4.1). Diese wird aus einem stabilen, linearen Homotrimer, welches durch die Assoziation von drei Heterodimeren entsteht, gebildet und durch die C-terminale HRB-Domäne der F_1 -Untereinheit geformt.

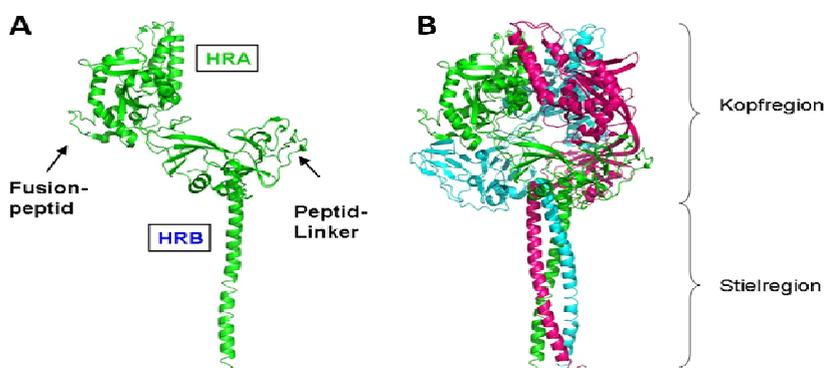


Abbildung 1.2.4.1: Darstellung des Fusionsproteins in der (A) Pre-Fusions-Konformation (modifiziert nach Yin et al., 2006). Die Heptad-repeat-Region B (HRB) ragt als lineare α -Helix senkrecht aus der Virusmembran und trägt die Kopfregion, welche das Fusionspeptid und die Heptad-repeat-Region A (HRA) als Vorstadium beinhaltet. (B) Schematische Darstellung eines Homotrimers mit der Einteilung in Kopf- und Stielregion.

Im Gegensatz zu den Fusionspeptiden der meisten anderen Paramyxoviren besitzt das NiV-F-Fusionspeptid am N-Terminus kein Phenylalanin, sondern ein Leucin (Harcourt et al., 2000). NiV-F enthält in der extrazellulären Domäne fünf potentielle N-Glykosylierungsstellen, von denen drei in der F₂-Untereinheit und zwei in der F₁-Untereinheit zu finden sind.

Nach Synthese aller viralen Proteine und der Generierung neuer Virusgenome findet das Assembly an der Plasmamembran statt. Die neusynthetisierten viralen Hüllproteine H und F werden in die Membran der infizierten Zelle inseriert und gehen über ihre zytoplasmatischen Domänen Wechselwirkungen mit dem Matrixprotein ein, was die Ausbildung einer Matrixschicht ermöglicht. Diese interagiert wiederum mit dem Ribonukleinkomplex und es kommt zur Freisetzung neuer Viruspartikel durch Knospung (Budding) oder Lyse der Zelle. Die Fusion ist also nicht nur für den Viruseintritt in die Wirtszelle, sondern auch später in der Infektion für die Virusausbreitung von Zelle zu Zelle wichtig. Wenn infizierte Zellen beide funktionelle virale Glykoproteine auf ihrer Oberfläche exprimieren, können sie mit rezeptortragenden Nachbarzellen fusionieren. Dabei ist ein Übertritt viraler Nukleokapside in nicht infizierte Zellen möglich, ohne dass Viruspartikel freigesetzt werden müssen. Bei dieser Zell-Zell-Fusion kommt es zur Ausbildung von Synzytien, die für den typisch zytopathischen Effekt (CPE) vieler Paramyxoviren in Zellkultur verantwortlich sind. Diese sogenannten Riesenzellen (Warthin Finkeldey) deuten dabei immer auf die Fusion von mehreren Nachbarzellen hin (Nozawa et al., 1994; Tajima et al., 1976; Bossart et al., 2002).

Abschließend kann man feststellen, dass es zwei Arten von F-Aktivierungen in der Familie der Paramyxoviridae gibt. Die Aktivierung von F-Proteinen mit einem einzigen basischen Aminosäurerest, einer so genannten monobasischen Spaltstelle, ist intrazellulär nicht möglich, da diese erst nach Expression des inaktiven Vorläufers F₀ auf der Zelloberfläche durch extrazelluläre trypsinähnliche Proteasen (TLPs) gespalten wird (Homma, 1971; Scheid und Choppin, 1974). Durch die Abwesenheit geeigneter trypsinähnlicher Proteasen (TLPs) in vielen Organen, ist die Aktivierung normalerweise auf den Ort des Viruseintritts, den Respirationstrakt, beschränkt. Demzufolge kann z. B. das Sendai-Virus nur respiratorische Infektionen verursachen, infektiöses Virus ist nur in den bronchialen Sekreten vorhanden (Scheid und Choppin, 1974; Tashiro et al., 1992). Paramyxoviren, die dagegen ein Fusionsprotein mit einer multibasischen Spaltsequenz besitzen, wie z. B. Masernviren (MV), können durch ubiquitär vorhandenes Furin aktiviert werden und nach einer initialen Infektion des Respirationstraktes systemisch replizieren (Klenk und Garten, 1994). Interessanterweise besitzt NiV-F nur einen einzelnen basischen Aminosäurerest R109 an der Spaltstelle, weshalb man vermuten kann, dass es wie andere F-Proteine mit monobasischen Spaltstellen, durch exogene TLPs aktiviert wird. Erstaunlicherweise ist jedoch *in vivo* die Replikation nicht so restringiert, wie man es für ein trypsin- oder TLP-abhängiges Virus erwarten würde. Eine Synzytienbildung, d. h. eine produktive Virusreplikation, ist im Respirationstrakt, in lymphoiden Organen sowie in den Endothelzellen kleiner Gefäße im ZNS, Lunge, Herz und Nieren zu beobachten (Hooper et al., 2001). Im Vergleich zu anderen systemisch replizierenden Paramyxoviren unterscheidet sich NiV also dadurch, dass es ein Fusionsprotein mit einer monobasischen Spaltstelle besitzt, welches allerdings ubiquitär durch zelluläre Proteasen aktiviert werden kann. Diese Protease braucht weder eine monobasische noch eine multibasische Schnittstelle und unterscheidet sich daher von furin- oder trypsinähnlichen Proteasen, die bisher für die Aktivierung der Fusionsproteine von Paramyxoviren bekannt sind (Moll et al., 2004).

Das **Hämagglutinin** (H, 77 kDa; bei MV) gehört zu den Typ-II-Transmembranproteinen und wird im ER synthetisiert, wo im Laufe der Reifung zwei Moleküle durch Disulfidbrücken zu Dimeren verbunden werden. Es besitzt kein Signalpeptid am aminoterminalen Ende, sondern eine hydrophobe Sequenzfolge von 25 - 30 AS in der Nachbarschaft des Aminoterminus. Diese bewirkt den Transport des Translationskomplexes zur Membran des ER, erlaubt das Durchschleusen der Proteinkette in das Lumen und dient als Transmembranregion zur Verankerung des Polypeptids. Da hier keine Signalase schneidet, befinden sich die etwa 30 - 40 AS am aminoterminalen Ende im Zytoplasma und die Sequenzen im Anschluss an die hydrophobe Domäne im Lumen des ER – hier werden sie durch Anfügen von Zuckergruppen an den 1 - 6 N-Glykosylierungsstellen modifiziert. An der Zelloberfläche erscheint das Hämagglutinin als Tetramer (Malvoisin und Wild, 1993). Die Funktion des H-Proteins ist die Rezeptorbindung, d. h. die Bindung des Virus an entsprechende Zielzellen. Es ist somit für die

Wirts- und Zelltypspezifität der verschiedenen Morbilliviren verantwortlich. Expressionsversuche haben zudem gezeigt, dass es nur bei einer Doppelexpression von H und F zu einer effizienten Fusion kommt, was neben der Bindungsfunktion eine Art Fusionshelfer-Aktivität des Hämagglutinins belegt (Wild et al., 1991). Dies ist auch bei NiV der Fall, bei dem das G-Protein als essentieller Kofaktor fungiert (Tamin et al., 2002). Ursprünglich wurde das Masern-Hämagglutinin nach der Fähigkeit des Impfvirus benannt, Affenerythrozyten zu agglutinieren. Im Gegensatz zu andern Morbilliviren, wie z. B. dem Masern-Virus, konnte für das CDV-H-Protein keine hämagglutinierende Wirkung gezeigt werden (Appel und Gillespie, 1972). Das Hämagglutininmolekül ist in vier Domänen eingeteilt, die als globulärer Kopf, Stamm 1 und 2, Transmembrandomäne und zytoplasmatischer Schwanz bezeichnet werden (siehe Abbildung 1.2.4.2 A und B).

Das H-Protein sorgt außerdem durch seine Faltung und Struktur für einen optimalen Abstand zur Zielmembran bei der Fusion und stabilisiert diese Interaktion. Die zytoplasmatische Region des H-Proteins ist außerdem für den Transport an die Zelloberfläche verantwortlich und enthält ein basolaterales Lokalisationssignal für polarisierte Zellen (Moll et al., 2001).

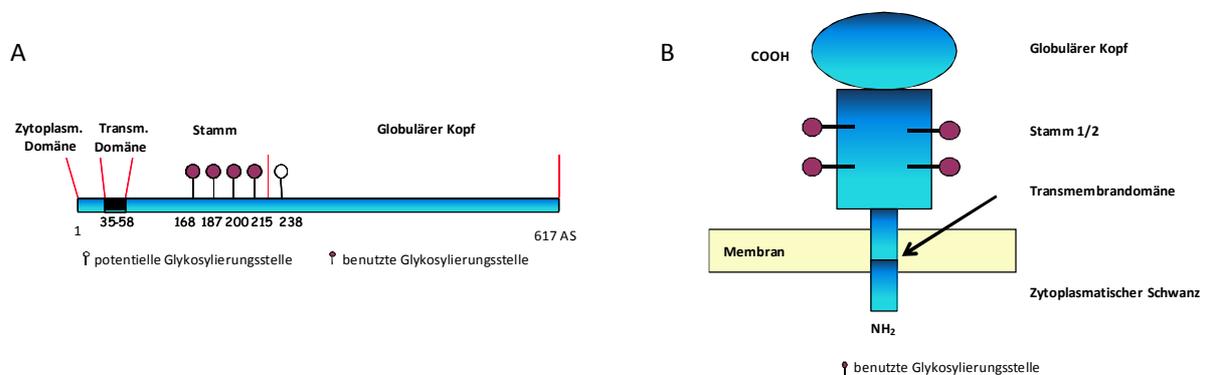


Abbildung 1.2.4.2: (A) Schematische Darstellung des MV-H und Einteilung in die für die Domänen kodierenden Regionen. (B) Vereinfachtes Strukturmodell des H-Proteins von Morbilliviren (nach Langedijk et al., 1997).

Das NiV-Glykoprotein G ist ein wenig kleiner als das H-Protein der Morbilliviren, hat ein Molekulargewicht von 67 kDa und ist ein Typ II-Membranprotein. Es besitzt sieben potentielle N-Glykosylierungsstellen in der Ektodomäne (Harcourt et al., 2000) und hat mit der N-terminalen, zytoplasmatischen Domäne, der folgenden Transmembrandomäne, der kurzen extrazellulären Stielregion und der großen globulären Ektodomäne strukturelle Ähnlichkeit mit dem zuvor beschriebenen H-Protein. Ebenso wie dieses bildet NiV-G wohl über intermolekulare Disulfidbrücken nahe der Transmembranregion Homodimere, wobei im Viruspartikel und auf der Oberfläche infizierter Zellen vermutlich zwei Dimere nichtkovalent zu einem Tetramer zusammengelagert sind (Crennell et al., 2000; Morrison und Portner, 1991).

Im Gegensatz zu den rezeptorbindenden Proteinen Hämagglutinin (H) der Morbilliviren und der Hämagglutinin-Neuraminidase (HN) der Paramyxo- und Rubulaviren besitzt das G-Protein weder eine hämagglutinierende noch eine Neuraminidase-Aktivität (Eaton et al., 2004; Wang et al., 2001).

1.3 Epidemiologie und Pathogenese des Flavivirus Dengue

Die Flaviviridae sind eine Familie von Viren, die einzelsträngige RNA positiver Polarität enthalten, die infektiös ist. Da der typische Vertreter der gesamten Familie das Gelbfieber-Virus (flavus = gelb) ist, werden diese Viren auch als Flaviviren bezeichnet. Es gibt verschiedene Subgruppen, wobei alle Viren serologisch miteinander verwandt sind. Zur den Flaviren gehört unter anderem auch das Dengue-Virus (DENV).

Dengue-Virus Infektionen gehören zu den am häufigsten auftretenden Krankheiten, die durch Moskitos der Gattung *Aedes* übertragen werden (Arbovirose). Die Viren werden primär durch die Weibchen der Stechmücke *Aedes aegypti* (Gelbfiebermücke), eine afrikanische Spezies, die während des 17. - 19. Jahrhunderts durch Sklavenhandel und Schiffindustrie über die Welt verbreitet wurde, übertragen. Außerdem gelten als weitere biologische Vektoren die sich weltweit ausbreitende Tigermücke *Ae. albopictus*, die im tropischen Pazifik heimische *Ae. polynesiensis* und *Ae. scutellaris*. Die Mücken infizieren sich hauptsächlich über das Stechen von bereits erkrankten Personen (urbaner Transmissionszyklus). Außerdem scheint wohl eine Übertragung von Dengue-Viren vom Mückenweibchen auf ihre Eier (transovarisch) möglich zu sein (WHO, 2008). Nach einer Inkubation von 8 bis 10 Tagen innerhalb der Mücke können Dengue-Viren auf den Menschen übertragen werden. Bisher wurden Menschen als einziges größeres Reservoir für Dengue-Viren angenommen. Neue Studien zeigen jedoch, dass gewisse Affenarten ebenfalls an Dengue erkranken und vielleicht auch als Quelle für infizierte Mücken dienen können (zoonotischer Zyklus). Die infektiöse Dosis beim Menschen liegt bei 1 - 10 Viruspartikeln. Da die Erkrankung bei nicht erfolgter Doppel- oder Sekundärinfektion sehr selten einen tödlichen Verlauf nimmt, kann man sehen, dass sich das Virus sehr stark an den Menschen als seinen Wirt angepasst hat.

Infektionen mit Dengue-Viren können asymptomatisch verlaufen oder undifferenziertes Fieber mit grippeähnlichen Symptomen, also Denguefieber (DF), hervorrufen, ebenso wie hämorrhagisches Denguefieber (DHF) oder das Dengue-Schock-Syndrom (DSS). Die WHO schätzt jährlich 50 - 100 Mio. Erkrankungen weltweit, wovon 250 - 500.000 die schwerere Verlaufsform, das hämorrhagische Denguefieber, entwickeln. 90 % der DHF-Erkrankungen kommen bei Kindern unter 15 Jahren vor und die Todesrate liegt im Alter von bis zu 1 Jahr bei etwa 30 %. Zurzeit ist Dengue in 112 Ländern der Welt endemisch. Bisher gibt es gegen die Erkrankung weder eine Impfung noch eine spezifische antivirale Behandlung. Die einzige Möglichkeit, die Krankheit einzudämmen ist, den Überträger, also den Moskitovektor, zu bekämpfen. Im Zeitraum von 1950 bis 1960 versuchte man als Prävention die Bekämpfung von Mückenbrutplätzen. Dabei finden sich die Larven aber nicht nur in stehenden Gewässern, sondern auch in der Kanalisation, vorhandenen Grabensystemen sowie unverschlossenen Wasserbehältern (Brunnen, Zisternen, Kloaken). Aber auch Behälter und Abfall, in denen sich Regenwasser sammelt (Eimer, Dosen, Autoreifen, Plastikfolien), reichen für die Entwicklung der schnell wachsenden Larve der *Aedes*-Mücke aus. Durch Verwendung von Insektiziden sowie das Trockenlegen von Sumpfbereichen konnten vorübergehend Erfolge verzeichnet werden. Diese wurden jedoch nicht weiter verfolgt, da die damit verbundenen negativen Folgen für die Umwelt, wie die Insektizidbelastung und das Aussterben anderer Insektenarten, zu gravierend waren. Da die Mücken jedoch schnell Resistenzen gegen die eingesetzten Insektizide wie DDT bildeten, war klar, dass diese Maßnahmen längerfristig erfolglos geblieben wären. Seit einiger Zeit wird ein nur die Larve angreifendes Insektizid eingesetzt, welches als ökologisch verträglich gilt und aus dem Bakterium *Bacillus thuringiensis israelensis* gewonnen wird. Seine Wirksamkeit ist jedoch noch nicht eindeutig nachgewiesen. Ein weiteres biologisches Mittel zur Bekämpfung des Überträgers *Aedes aegypti* ist *Mesocyclops thermocyclopoides*, ein in stehenden Tümpeln vorkommender tropischer Ruderfußkrebs, der sich unter anderem von Stechmückenlarven ernährt (Kay et al., 2005; Schaper et al., 2001). Weitere einfache und wirksame Maßnahmen sind die Gaben von Chlor oder Sand in Wasserreservoirs, wie beispielsweise in die Untersetzer von Topfpflanzen. Denguefieber kann aber aktiv vermieden werden, wenn man sich vor Mückenstichen schützt. Prophylaktische Maßnahmen sind: Mückengitter, Moskitonetz und bedeckende Kleidung, wobei unbedeckte Hautstellen unbedingt mit Repellentien behandelt werden sollten.

Das Denguefieber ist auch als Sieben-Tage-Fieber (DRG Research-Group Universität Münster) oder Knochenbrecherfieber (wegen der starken Gliederschmerzen, die durch die Virusinfektion verursacht werden)

bekannt. Die Herkunft des Namens „Dengue“ ist nicht eindeutig geklärt. Verschiedene Quellen berichten, dass das Wort „Dengue“ aus dem afrikanischen Sprachraum (Suaheli: Ka-dinga pepo) kommt und für einen Krampfanfall steht, der von bösen Geistern ausgelöst wird (Duden; Herkunftswörterbuch). Eine andere Hypothese besagt, dass sich das Wort aus dem Spanischen ableitet und mit Mätzchen übersetzt werden kann. Diese Bezeichnung deutet auf die schmerzbedingte, auffällig eigenartige Veränderung der Körperhaltung und Verhaltensweise bei erkrankten Personen hin.

Während des 19. Jahrhunderts wurde Dengue als sporadische Krankheit angesehen, die Epidemien nur in langen Intervallen hervorruft. Die erste dokumentierte Epidemie verlief zwischen 1779 und 1780 gleichzeitig in Asien, Afrika und Nordamerika, was eine mindestens 200 Jahre alte weltweite Verbreitung belegt. Die Krankheit stammt ursprünglich aus Afrika und ist vor etwa 600 Jahren nach Asien eingeschleppt worden. Der internationale Handel, wie beispielsweise Containerschiffe mit Obstimporten aus Afrika, das schnelle Bevölkerungswachstum und die Urbanisierung ermöglichten es infizierten Mückenlarven, weitere Infektionsgebiete zu eröffnen, in denen sie normalerweise nicht vorkamen. Auch in den Tropen infizierte Reisende können die Erkrankung in normalerweise sichere Gebiete einschleppen. Mittlerweile wird Dengue als die wichtigste durch Moskitos übertragene Krankheit angesehen. DHF ist zum ersten Mal als öffentliches Gesundheitsrisiko in Erscheinung getreten, als 1954 eine Epidemie in Manila ausbrach, die sich auch in anderen Ländern der Region ausbreitete. Normalerweise dominiert ein Serotyp in einem Gebiet, bis eine erhöhte Immunität die Übertragung eindämmt. Anschließend dominiert ein anderer Serotyp. DENV verändert sich genetisch während der natürlichen Übertragung und so wurden signifikante biologische Unterschiede zwischen Stämmen des gleichen Serotyps gezeigt (Russell et al., 1972; Gubler et al., 1978).

1998 brach eine Pandemie mit Dengue-Virus Infektionen aus, wobei 1,2 Mio. Fälle von DF und DHF aus 56 Ländern weltweit gemeldet wurden. Die Weltbevölkerung wurde mit einem neuen Subtyp (Subtyp III) von DENV-3 konfrontiert, welcher als erstes in Indien ausbrach. Von dort breitete er sich in die angrenzenden Länder aus (Messer et al., 2003). Im Jahre 2002 wurde in Malaysia eine erste große Epidemie mit 29.615 Fällen erfasst, bei der rund 1.500 Patienten DHF entwickelten und 55 starben (Promed, 2002). So auch im Oktober 2005, als 160.000 Patienten in Südamerika erkrankten, wovon 247 DHF entwickelten und 25 Opfer starben (Labor Spiez, 2005). Im Jahre 2006 traten Epidemien des Fiebers sowohl in der Dominikanischen Republik als auch in Kuba auf (Diario Libre, 2006). Nach verschiedenen Berichten wurden in Kuba besonders betroffene Stadtteile von Havanna und vier Provinzen von den Gesundheitsbehörden zeitweise abgeriegelt. Es wurden Hilfslazarette eingerichtet und Spezialeinheiten waren weit über das übliche Maß hinaus zur Bekämpfung der Moskitos im Einsatz. Seit November wurden nur noch vereinzelte Fälle bekannt. Es gab jedoch Berichte von vermehrten hämorrhagischen Verläufen der Infektion. Eine Ursache könnte der mehrfache Wechsel des vorherrschenden Serotyps auf Kuba sein (1977: Dengue-1, 1981: Dengue-2, 2001: Dengue-3) (Promed, 2006). Anfang 2007 kam es in vielen südamerikanischen Ländern zu vermehrtem Auftreten von Denguefieber. Am 23. Februar 2007 verhängte die Regierung von Paraguay, nach dem Ausbruch einer Denguefieber-Epidemie (nach offiziellen Angaben mehr als 15.000 Erkrankte), für 60 Tage den Ausnahmezustand. Der an Paraguay grenzende brasilianische Bundesstaat Mato Grosso do Sul verzeichnete 42.000 Krankheitsfälle (Anfang März 2007). In beiden Ländern kam es zu mehreren Todesfällen, teilweise infolge von hämorrhagischen Verlaufsformen der Erkrankung. Zeitungsberichten (Folha de S. Paulo, 2008) zufolge sind im brasilianischen Bundesstaat Rio de Janeiro die Zahlen der Infektionen und Todesfälle, insbesondere von Kindern, deutlich angestiegen und in den ersten 4 Monaten dieses Jahres wurden bereits 131.250 Denguefälle registriert, wovon 106 letale Folgen hatten.

Obwohl Dengue-Viren nicht direkt von Mensch zu Mensch übertragbar sind und Primärinfektionen meistens ohne Komplikationen ausgehen, könnten Dengue-Viren, insbesondere in tropischen oder subtropischen Regionen, über infizierte Mücken gestreut werden. Somit wurden sie als potentieller biologischer Kampfstoff eingestuft. Da vermutet wird, dass Stechmückenweibchen die Dengue-Viren ihren Nachkommen weitergeben, breitet sich das DF in feuchten, dicht bevölkerten Gebieten rapide aus. Als möglicher bioterroristischer Einsatz von Dengue-Viren wird eine Epidemie im Jahre 1981 auf Kuba beschrieben. Dabei erkrankten in 5 Monaten über 350.000 Personen an DF und DHF/DSS, wovon 158 verstarben. Zwar wurden vier Jahre zuvor ebenfalls

über 400.000 Erkrankungen gemeldet, jedoch waren diese über das ganze Jahr verstreut und ohne hämorrhagische Verlaufsformen. Der in Kuba isolierte Dengue-Virus Serotyp 2 wurde bis dahin allerdings nur im Jahre 1924 in Neu Guinea nachgewiesen. Es konnte jedoch gezeigt werden, dass das amerikanische Personal der US-Militärbasis Guantanamo auf Kuba kurz vor der Epidemie mit Dengue-Viren des Serotyps 2 geimpft wurde. Bereits 1982 publizierte das US Magazin „Covert Action“ einen Artikel, in dem der Verdacht ausgesprochen wurde, die Epidemie in Kuba sei auf einen CIA-Anschlag zurückzuführen (Covert Action, 1982). Dengue-Viren waren eine der mehr als ein dutzend Agentien, die die USA als potentielle biologische Waffe untersuchten, bevor das nationale Programm für Biowaffen eingestellt wurde (Chemical and Biological Weapons, 2008).

Aufgrund der globalen Erwärmung breitet sich das Denguefieber nunmehr auch in den gemäßigten Breiten aus. Hauptverbreitungsgebiet sind heute Lateinamerika, Zentralafrika, Indien, Südostasien, Teile des Pazifiks (u. a. Neukaledonien) und der Süden der USA. Auch nach Europa wird das Fieber heute regelmäßig eingeschleppt. Mit jährlich etwa 100 - 200 eingeschleppten Fällen (7 % der Tropenrückkehrer mit Fieber) gehört Dengue zu den häufigsten viralen Infektionen bei deutschen Urlaubern (Frank et al., 2004). Die meisten Dengue-Virus Infektionen erfolgen bei Reisen in den asiatischen Raum (71 %) gefolgt von Amerika (22 %) und Afrika (7 %) (RKI, 2008). Heute leben über 2,5 Milliarden Menschen in den Risikogebieten der Tropen und Subtropen.

Obwohl sich die 4 Serotypen weltweit rapide verbreitet haben, dominieren in bestimmten Regionen gewisse Subtypen oder deren Mischungen. Während in Südostasien und der Karibik alle vier Virustypen vertreten sind, herrschen in Südamerika die Serotypen 1, 2 und 4 vor. In Mittelamerika, in den USA und in Ostafrika sind die Subtypen 2 und 3 am meisten vertreten und in Westafrika treten die Typen 1 und 2 auf, während in der Pazifikregion (Polynesien) Typ 2 sehr verbreitet ist. Die verschiedenen Serotypen zeigen dabei Unterschiede in den AS-Sequenzen der E-Proteine, die eine Schlüsselrolle bei schwereren Dengue-Infektionen spielen. Während einer primären Infektion mit einem bestimmten Dengue-Subtyp werden vom Organismus Antikörper gebildet, die für diesen Subtyp spezifisch sind. Erfolgt nun eine Sekundärinfektion mit einem anderen Subtyp, binden zwar aufgrund der ähnlichen AS-Sequenz beider Virustypen die AK auch an die Oberfläche des zweiten Subtyps, können diesen aber nicht neutralisieren. Dabei bindet der Fc-Teil dieser AK an Fc γ RI- und Fc γ RII-tragende Zellen, vor allem Makrophagen, was die Infektion dieser Zellen verstärkt (Littau et al., 1990). Dadurch können Viruspartikel einfacher in Makrophagen eindringen und in ihnen replizieren. Diese Infektionsverstärkung tritt allerdings nur bei subneutralisierenden Konzentrationen von Dengue-Antikörpern auf und wird als „Antibody dependent enhancement“ (ADE) bezeichnet.

Für das Dengue-Virus sind bereits viele mögliche Rezeptoren vorgeschlagen worden. So ist Heparansulfat auf der Zielzelle offensichtlich essentiell für das Binden des E-Proteins und beeinflusst somit die Infektivität (Chen et al., 1997). Es wurden außerdem LPS/CD14-bindende Proteine (Chen et al. 1998), multimere Proteinkomplexe (Marianneau et al., 1996), andere Proteine (Salas-Benito et al., 1997; Ramos-Castaneda et al., 1997; Sakoonwatanyoo et al., 2006) und DC-Sign (Tassaneetrithep et al., 2003) als mögliche Rezeptoren vorgeschlagen. In aktuellen Studien wird ein möglicher Rezeptor mit einer Größe von 64 - 67 kDa diskutiert, der durch die Proteine R 67 und R 64 vertreten sein soll (Mercado-Curiel et al., 2008).

Dengue-Viren gelangen durch den Stich einer infizierten Mücke in den Organismus und infizieren bevorzugt Makrophagen und dendritische Zellen, die sich in der lokalen Umgebung befinden. Diese bringen das Virus über die Lymphbahnen zu den Lymphknoten, wo die Viren weitere Zielzellen wie Monozyten und B-Zellen vorfinden und sich in ihnen replizieren. Neben den dendritischen Zellen sind Endothelzellen, B-Zellen, Mastzellen und Knochenmarkzellen infizierbar (King et al., 2000; Ho et al., 2001; Huang et al., 2000). Die Inkubationsphase dauert etwa 7 bis 10 Tage, wobei der Patient nach dieser Phase virämisch ist. Dabei lassen sich 10^8 bis 10^9 infektiöse Partikel pro Milliliter Blut nachweisen, was durchschnittlich vier bis fünf Tage anhalten kann. Während dieser Phase wird der Patient fiebrig und infektiös. Danach erholt er sich oder entwickelt das DF, DHF oder DSS (Malavige et al., 2004):

Undifferenziertes Fieber: Diese Erkrankung folgt normalerweise einer Primärinfektion, kann aber auch bei sekundären Infektionen auftreten. Klinisch ist sie nicht von anderen viralen Infektionen unterscheidbar.

Denguefieber (DF): Denguefieber tritt während primären und sekundären Infektionen auf. Dabei treten plötzlich hohes Fieber (40 - 41 °C), starke Kopf- und Gelenkschmerzen (charakteristisch sind Rückenschmerzen), Appetitlosigkeit und abdominale Schmerzen auf. Das Fieber kann 6 - 7 Tage anhalten (Narayanan et al., 2002) und kann außerdem einen biphasischen Verlauf nehmen. Dabei steigt das Fieber die ersten 3 - 4 Tage hoch an, sinkt in den folgenden 2 Tagen unter starkem Schwitzen und steigt am 7.Tag wieder stark an. Insgesamt verläuft das DF relativ mild (manchmal langwierig) und heilt ohne Komplikationen aus. In sehr seltenen Fällen entwickelt eine Primärinfektion ein hämorrhagisches Denguefieber (DHF). Die Infektion mit einem Serotyp hinterlässt eine lebenslange serotypenspezifische Immunität. Eine Sekundärinfektion mit einem anderen Dengue-Serotyp kann mit einer hundertmal höheren Wahrscheinlichkeit (als bei einer Primärinfektion) DHF auslösen.

Hämorrhagisches Denguefieber (DHF): DHF tritt normalerweise nach sekundären Infektionen auf, folgt aber vor allem in Kindern unter 1 Jahr auch gelegentlich primären Infektionen. Bei diesen Kindern wird die Infektion vermutlich durch maternal erworbene Dengue-Antikörper verstärkt (Martinez et al., 1993). DHF ist charakterisiert durch schnell ansteigendes hohes Fieber, Kopf- und Gliederschmerzen, Erbrechen, Atemnot und Kreislaufversagen. Bereits 2 bis 6 Tage nach Krankheitsbeginn leitet ein plötzlicher Fieberabfall die Hämorrhagien besonders in Haut und Schleimhäuten ein. Dabei wird die Durchlässigkeit der Blutgefäßwände erhöht und es kommt auch im oberen Teil des Gastrointestinaltrakts zu unkontrollierten Blutungen. An diesem Punkt erholt sich der Patient, weil das Fieber plötzlich sinkt oder es kommt zum Dengue-Schock-Syndrom.

Dengue-Schock-Syndrom (DSS): Durch den Austritt von Blutplasma in die Körperhöhlen kann sich das Dengue-Schock-Syndrom entwickeln, eine schwere Form des DHF. 2,5 bis 5 % der Sekundärerkrankungen lösen DHF bzw. DSS aus. Die Letalität liegt zwischen 10 % und 50 %, wobei der Wert bei Kleinkindern besonders hoch ist. Der Verlust des Blutplasmas ist assoziiert mit einer fleckigen Haut, Zyanose und Kreislaufbeschwerden. Ein länger anhaltender Schockzustand wird häufig von einem Absinken des pH-Wertes im Körper begleitet, was zu einer intravaskulären Gerinnung führt, die wiederum eine massive Hämorrhagie hervorruft. Das Dengue-Schock-Syndrom wird gelegentlich auch von Enzephalopathien begleitet.

1.4 Biologie des Dengue-Virus

1.4.1 Taxonomie

Das Dengue-Virus ist ein behülltes einzelsträngiges (+)-Strang-RNA-Virus, welches zur Gattung Flavivirus und zur Familie der Flaviviridae gehört. Diese enthält drei Genera: *Flaviviren*, *Pestiviren* und *Hepaciviren*. Zum Genus der Flaviviren gehört außer dem Gelbfiebertvirus eine Reihe von humanpathogenen Erregern, die durch Insekten übertragen werden, weshalb sie auch in die Familie der Arboviren (Arthropode-born viruses) untergliedert werden. Voraussetzung für die Übertragung von Viren durch Arthropoden ist, dass sie bestimmte Organe wie die Epithelzellen des Darmes oder der Speicheldrüsen infizieren können, da allein die Aufnahme von infektiösem Blut nicht ausreicht. Daher müssen diese Viren sowohl in Insekten- als auch in Säugetierzellen replizieren können. Die Erreger der Gattung Flavivirus rufen sowohl beim Menschen, als auch beim Tier eine Vielzahl an Virusinfektionen hervor. Hierzu zählen u. a. das Gelbfieber, das Denguefieber, die Frühsommer-Meningoenzephalitis (FSME), das West-Nil-Fieber, die Louping III, die Wesselsbron-Krankheit (Schafe, Ziegen) und die japanische B-Enzephalitis (Vögel, Schweine und Menschen).

Beim Dengue-Virus gibt es vier Serotypen: DENV 1, DENV 2, DENV 3 und DENV 4. Diese Viren sind genetisch sehr eng miteinander verwandt, und es treten Kreuzreaktionen in serologischen Tests auf.

Bislang einzige Vertreter der Hepaciviren ist das Hepatitis-C-Virus, das die Hepatitis C beim Mensch hervorruft und das sehr nah verwandte Hepatitis-G-Virus. Da seine NS-Sequenz des Polyproteins aber zu 28 % dem des Hepatitis-C-Virus gleicht und zu 20 % dem Gelbfiebertvirus, ist noch unklar, welchem Genus es zuzuordnen ist.

Die Viren der Gattung Pestivirus spielen ausschließlich bei Tieren als Krankheitserreger eine Rolle. Hierzu zählt u. a. das BVD/MD-Virus (Bovine Virusdiarrhö; Mucosal Disease) und die Border disease der Schafe.

1.4.2 Morphologie

Alle Vertreter dieser Familie sind mit einer Hüllmembran umgeben und haben eine Größe zwischen 40 - 50 nm. Flaviviren besitzen ein isometrisches, sphärisches Capsid mit einem Durchmesser von 30 - 35 nm, das nur aus dem viralen, stark basischen Coreprotein (C) besteht. Dieses ist mit der positiven, einzelsträngigen und 10,7 kb großen RNA komplexiert und bildet so das Nukleocapsid, welches von einer Hüllmembran umgeben ist, in die die beiden Oberflächenproteine, das Envelopeprotein (E) und das Membranprotein (M), eingelagert sind. Dabei liegen 90 E-Proteindimere in einer parallelen Konformation zur Membran und an der Innenseite der Lipidhülle sind genau 180 M-Proteine lokalisiert (Kuhn et al., 2002) (siehe Abbildung 1.4.2.1 A und B). Im Jahre 1944 identifizierten Albert Sabin und J. Schlesinger die ersten Dengue-Virus Partikel aus Blut von infizierten Soldaten.

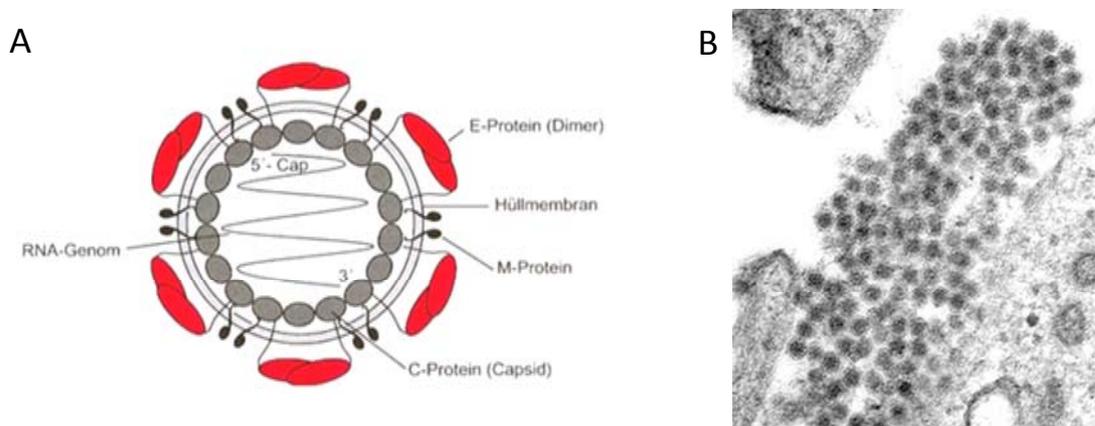


Abbildung 1.4.2.1: (A) Aufbau eines Dengue-Virus Partikels (Molekulare Virologie; S. Modrow); (B) Elektronenmikroskopische Aufnahme von DENV 2 Partikeln in einer 5 Tage alten Gewebeinfektion (Vergrößerung: 123.000fach; CDC).

1.4.3 Genomaufbau

Das Genom der Dengue-Viren ist ein 10,7 kb langes Molekül aus einzelsträngiger, unsegmentierter RNA in Plusstrangorientierung. Sie besitzt einen großen offenen Leserahmen und kann in der Wirtszelle direkt als mRNA wirken - sie ist somit infektiös. Das Genom enthält außerdem kurze untranslatierte Regionen am 3'- und 5'- Ende, eine Capstruktur am 5'- Ende und einen nicht polyadenylierten 3'-Terminus. An diesem sind jedoch Bereiche adenosinreicher Basenfolgen variabler Länge lokalisiert. Außerdem findet mit dem Genom als Matrize die Synthese eines ca. 3.400 AS langen Vorläuferproteins statt, das im Infektionsverlauf in die einzelnen Komponenten gespalten wird.

Das Genom kodiert für 3 Strukturproteine am aminoterminalen Ende in der Reihenfolge Capsid (C-), prM- als Vorläuferproteine des M-Proteins und das Envelope-Protein (E) (Bell et al., 1985). Daran schließen sich die Sequenzfolgen der 7 Nicht-Strukturproteine an (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b und NS5) (siehe Abbildung 1.4.3.1).

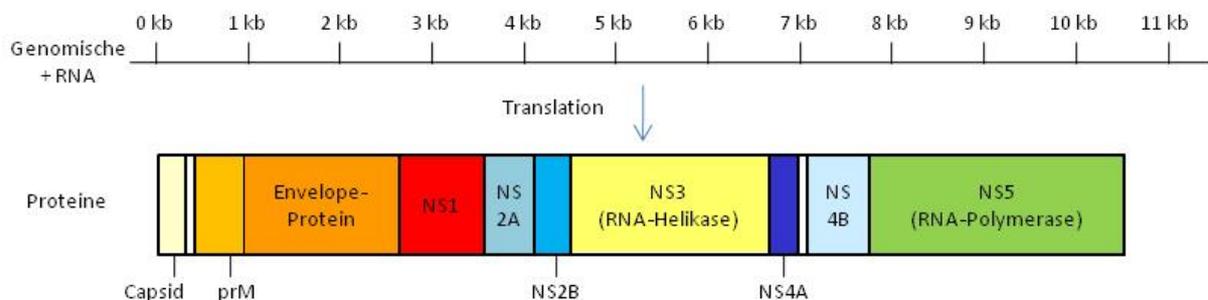


Abbildung 1.4.3.1: Dengue-Virus Genom mit Struktur- (prM-, Capsid-, Envelope-Protein) und Nichtstrukturproteinen (NS1 - 5).

Nach Aufnahme des Virus in die Zelle interagiert das 5'-Ende des Genoms mit zellulären Ribosomen-untereinheiten. Diese Aufgabe übernimmt im Falle des Dengue-Virus die 5'-Cap-Struktur, die sich an Komponenten des Cap-Binding-Komplexes bindet und Interaktion mit den Ribosomen vermittelt.

Die kompletten Sequenzen der Genome aller vier Serotypen sind bekannt (Fu et al., 1992, Hahn et al., 1988; Osatomi et al., 1990; Mackow et al., 1987).

1.4.4 Funktion der Flavivirus Hüllproteine

Das RNA-Genom der Flaviviren besitzt ein großes offenes Leseraster, das für ein ca. 3.400 AS langes Vorläuferpolyprotein kodiert.

Das **Vorläuferpolyprotein** wird in die einzelnen, funktionell aktiven Bestandteile durch umfangreiche co-translationale und post-translationale proteolytische Prozessierungen gespalten. Dies erfolgt zum Teil durch eine zelluläre Signalase, die assoziiert mit der ER-Membran vorliegt. Sie hat im zellulären Stoffwechsel die Aufgabe der Spaltung von Signalpeptiden an aminoterminalen Enden von am ER translatierten Proteinen. Die Spaltung generiert die primäre AS Sequenz der reifen Strukturproteine prM und E, sowie den Aminoterminus des Nichtstrukturproteins NS1, wobei am Übergang des E- und NS1-Proteins gespalten wird. Der aminoterminal Teil des Polyproteins wird als verankertes C-Protein entlassen, welches mit der Membran des rauhen ER assoziiert ist. Das membranassoziierte C-Protein wird durch Entfernung des carboxyterminalen hydrophoben Segments in ein reifes C-Protein umgewandelt. Für alle weiteren Prozessierungen sind die viralen Proteasen verantwortlich. Die im NS2-Protein vorhandene proteolytische Aktivität schneidet zwischen NS2- und NS3-Stellen, während die NS3-Protease dann abschließend alle weiteren Spaltungen vollzieht.

Das **prM-Protein** ist eines der zwei Membranglykoproteine und der Vorläufer des sehr kleinen, in der Virusmembran verankerten M-Proteins. Das prM-Protein hat ein Molekulargewicht von 22 kDa, während das kleinere M-Protein lediglich ein Molekulargewicht von 7 - 9 kDa aufweist. Das prM-Protein ist an Asparaginresten glykosyliert. Am Ende der Virusreifung wird der aminoternale Anteil des prM-Proteins während der Passage durch den Golgi-Apparat durch eine furinähnliche, zelluläre Protease (Signalase) abgespalten. Das reife M-Protein ist somit ausschließlich in den reifen extrazellulären Virionen vorhanden.

Als zweites Membranglykoprotein ist das **E-Protein** in der Virushülle verankert. Sein Molekulargewicht beträgt 51 - 60 kDa, es liegt als Homodimer (Abbildung 1.4.4.1 B) vor und ist über eine hydrophobe AS-Folge im carboxyterminalen Bereich mit der Membran verankert. Dort liegt es flach auf und bestimmt aufgrund der durch die Proteinfaltung bedingten Krümmung die Größe des Partikels. Seine Aufgabe ist es, die Adsorption an die Zielzelle zu vermitteln. Zusätzlich ist es für die hämagglutinierenden Eigenschaften der Flaviviren verantwortlich. Während einer Infektion führt die Anwesenheit von E-Proteinen zu einer Induktion von neutralisierenden Antikörpern (AK) und zur allgemeinen Immunantwort (Guzman et al., 1996), die vor einer Neuinfektion mit dem gleichen Serotyp schützen.

Das E-Protein wurde intensiv untersucht, da es bei der Pathogenese eine Schlüsselstellung innehat und es besitzt 37 % Sequenzidentität mit dem E-Protein des Tick-born Enzephalitis-Virus (TBE). Beide Proteine besitzen eine Liganden-Bindungstasche (Modis et al., 2003) und drei Antigenomänen (I, II und III) die von ca. 500 AS (Mandl et al., 1989) gebildet werden, wobei Domäne II (AS 50 - 130 und 185 - 300) eine lineare diskontinuierliche Dimerisations-Domäne ist und außerdem das Fusionspeptid enthält. Domäne I (AS 130 - 185) wird strukturell durch 5 Disulfidbrücken stabilisiert und enthält vor allem virusneutralisierende Epitope. Domäne III (AS 300 - 400) hat zwischen dem Cystein 11 und 12 eine Disulfidbindung, die entscheidend an der Antigenität dieser Domäne beteiligt ist (Advances in Virus Research, 2005). Alle drei Domänen bilden den Kopf des E-Proteins (siehe Abbildung 1.4.4.1 A), wobei die AS 400 - 500 einen Schwanz mit einem 50 AS langen hydrophoben Ende formen. Mit dieser Region, die nicht wie bei den Paramyxoviren einen zytoplasmatischen Schwanz darstellt, wird das E-Protein auch mit Hilfe der Transmembranhelices der M-Proteine in der Virionhülle verankert.

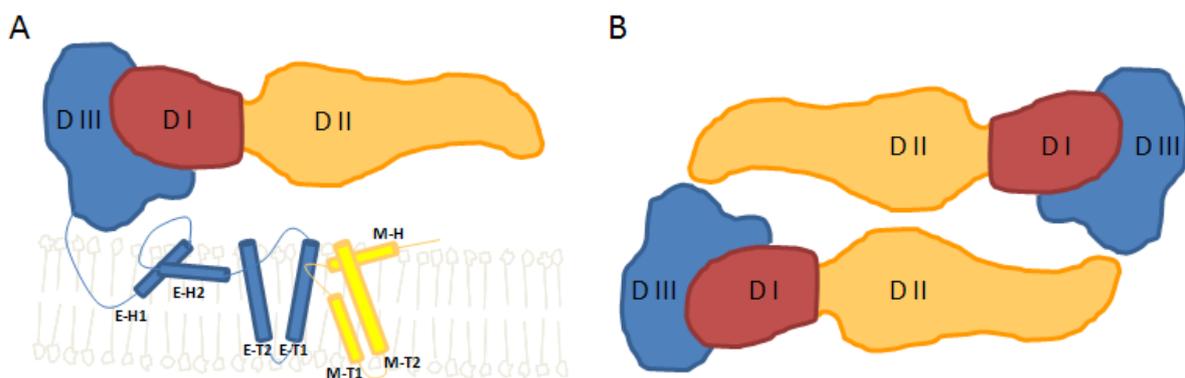


Abbildung 1.4.4.1: Struktur des E-Glykoproteins. Die Abbildung zeigt den homodimeren Proteinkomplex in Seitenansicht (A) und in Aufsicht (B). Der Stamm und die Transmembranhelices der E- (E-H1, E-H2, E-T1 und E-T2) und M-Proteine (M-H, M-T1 und M-T2) sind in blau und gelb gezeigt. Farbliche Markierung: Domäne I (rot), Domäne II (gelb), Domäne III (blau) (nach Mukhopadhyay et al., 2005).

Bei umhüllten Viren erfolgt entweder eine pH-unabhängige Fusion der viralen Hüllmembran mit der Plasmamembran (wie beispielsweise bei den Paramyxoviren) oder eine pH-abhängige Fusion nach der Endozytose (Skehel und Wiley, 2000).

So benötigen Flaviviren eine Konformationsänderung im Fusionsprotein durch sauren pH. Damit kann erst nach der Virusaufnahme im sauren Milieu der Endosomen die Membranfusion erfolgen und das Genom in das Zytoplasma entlassen werden (Marsh und Helenius, 1989). Der Viruseintritt mittels Endozytose bietet eindeutige Vorteile: so werden Viren z. B. nur von Zellen mit aktivem Membrantransport aufgenommen, es gibt also keine „Dead end“-Infektion. Auch verbleiben nach der Aufnahme des Viruspartikels keine Virusproteine auf der Zelloberfläche und das Risiko der Detektion durch das Immunsystem sinkt. Letztlich werden die internalisierten Viruspartikel in den Endozytosevesikeln schnell und effizient über den Zellkortex aus Aktinfilamenten und durch das Zytoplasma bis in die Region transportiert, die für die Virusreplikation essentiell ist.

Dengue-Viren können neben der direkten Wechselwirkung der viralen Membranproteine mit definierten Zelloberflächenkomponenten auch einen zweiten Weg nutzen, um an die Zelle zu binden und aufgenommen zu werden. Dieser ist abhängig von dem Vorhandensein subneutralisierender, virusspezifischer oder typübergreifender, virusgruppenspezifischer Antikörper. Dabei gibt es besonders an bestimmte Domänen des E-Proteins bindende AK, die alle vier Serotypen erkennen können. So können Antikörper an bestimmte Viruspartikel binden und der Fc-Teil anschließend von Makrophagen oder Monozyten erkannt werden (Littau et al., 1990), wodurch die Virusaufnahme vermittelt wird.

Nach der Adsorption an die Zelloberfläche wird das Virus endozytiert und liegt in einem Membranvesikel im Zytoplasma der Zelle vor. Um aus diesem entlassen zu werden, macht sich das Virus die Ansäuerung über eine ATP-abhängige H⁺-Ionenpumpe, die Bestandteil der Vesikelmembran ist, im Innern des Endosoms zunutze. Als Folge kommt es zur Verschmelzung von Virus- und Zellmembran des Endosoms, wobei das E-Protein aktiv beteiligt ist, und das Capsid gelangt ins Zytoplasma. Da die virale RNA einer mRNA entspricht, kann diese sofort in ein Polyprotein translatiert werden. Dazu interagiert das 5'-Ende mit der 5'Cap-Struktur des viralen Genoms mit dem Cap-binding-complex der zellulären Ribosomenuntereinheiten. Nun kann die Translation beginnen, bis das C-Protein im aminoterminalen Bereich des Vorläuferproteins vorliegt. Es folgt eine kurze Unterbrechung des Translationsprozesses, da die hydrophobe Domäne im carboxyterminalen Bereich wie ein Signalpeptid wirkt und mit dem Signal recognition particle, einem Komplex aus zellulären Polypeptiden und 5S-RNA, interagiert. Dies bewirkt, dass der Translationskomplex an die Membran des ER verlagert wird, wo die wachsende Aminosäurekette durchgeschleust wird und sich die Transmembrandomänen des prM- und E-Proteins des Polyproteins co-translational in dieser verankern. Anschließend führen die zellulären Signalasen des ER die Spaltung zwischen den C-, prM-, E- und NS1-Untereinheiten durch. Alle anderen Prozessierungen im Bereich der Nichtstrukturproteine werden durch das NS3-Protein durchgeführt, das zusammen mit NS2B als Protease wirkt. Da das Polyprotein zuvor in die ER-Membran eingelagert wurde, bleiben vermutlich alle Virusproteine damit assoziiert. Somit laufen auch alle weiteren Schritte im Infektionszyklus in räumlicher Nähe dieses Zellkompartiments.

Da in der Membran des ER C-, prM- und E-Virusstrukturproteine in hohen Konzentrationen eingelagert sind, kommt es nach Anlagerung von genomischen, viralen RNAs zur Ausstülpung der Membran (Budding) in das ER-Lumen und zur abschließenden Abschnürung der Virionen. Während des Transports in Golgivesikeln kommt es zur Glykosylierung der Membranproteine. Außerdem wird das prM-Protein durch furinähnliche Enzyme gespalten und zum M-Protein prozessiert. Somit können durch den Verlust des aminoterminalen Proteins reife Virionen aus der Zelle durch Fusion der Golgivesikel mit der Zytoplasmamembran freigesetzt werden.

1.5 Klasse I- und II-Fusionsproteine

Behüllte Viren sind auf die Fusionsproteine in ihrer Hüllmembran angewiesen, um die Fusion zwischen Virus- und Wirtszellmembran zu vermitteln. Dieser Schlüsselschritt beim Viruseintritt sorgt dafür, dass das virale Genom für die Replikation ins Zytoplasma entlassen werden kann.

Es sind bisher zwei Mechanismen der Virusfusion bekannt, die in die Klasse I- und II-Mechanismen eingeteilt werden. Klasse I-Mechanismen finden bei Viren statt, deren Fusionsproteinstruktur durch eine coiled-coil α -Helix-Faltung bestimmt wird, wie beispielsweise dem Fusionsprotein F der Paramyxoviren (Dutch et al., 1999), den Hüllproteinen der Retroviren oder dem HA-Protein der Orthomyxoviren. Im Vergleich dazu werden Klasse II-Mechanismen der viralen Fusion nur bei Viren beobachtet, deren Hüllproteine von einer β -Faltblattstruktur dominiert werden, wie dies beispielsweise in der Familie der Flaviviren oder der Alphaviren der Fall ist (Kilian et al., 2006; Hammar et al., 2004).

Klasse I-Proteine sind rechtwinklig zur Oberfläche der Hüllmembran angeordnet und eine hochkonservierte Fusionspeptid-Sequenz ist in der Nähe des NH_2 -Terminus des Fusionsproteins lokalisiert (siehe Abbildung 1.5.1). Sie variieren in ihrer Länge und Sequenz innerhalb der Klasse I-Proteine, haben aber eine sehr ähnliche, übergreifende Struktur. Sie bilden trimere Spikes in ihrer ursprünglichen, stabilen Konformation auf der Virionoberfläche. Die postfusionale Konformation ist meist eine haarnadelschleifenähnliche Struktur, in der das Fusionspeptid und der Membrananker (in der Nähe des C-Terminus) nebeneinander gestellt sind.

Klasse II-Fusionsproteine haben einen anderen Aufbau als Klasse I-Proteine. Das Hüllprotein der Flavi- und Alphaviren liegt tangential an der Virushüllmembran an und das Fusionspeptid befindet sich innerhalb der Sequenz des E-Proteins zwischen zwei β -Faltblattstrukturen (siehe Abbildung 1.5.1). Dabei besitzt das E-Protein drei Domänen, die als strukturelle zentrale aminoternale Domäne I, als Dimerisationsdomäne II und als carboxyterminale Ig-ähnliche Domäne III bezeichnet werden. Die E-Proteine werden als metastabile Form in einem Komplex mit einem zweiten viralen Oberflächenprotein, einer Art Chaperon, synthetisiert. Bei den Flaviviren handelt es sich um das prM-Protein, das dann durch seine proteolytische Spaltung (anstatt der proteolytischen Spaltung des Fusionsproteins selbst wie bei Klasse I-Proteinen) die Energiebarriere zwischen dem metastabilen Dimer auf der viralen Oberfläche und dem sehr stabilen in die Zielzellmembran inserierten Homotrimer herabsetzt, um so die Membranfusion einzuleiten (Stiasny et al., 1996). Bei allen drei Domänen finden sich β -Faltblattstrukturen (Rey et al., 1995) und auch hier sind sich die Proteine der Klasse II strukturell unter den verschiedenen Virusfamilien sehr ähnlich (Lescar et al., 2001; Kuhn et al., 2002). Weitere Untersuchungen zeigten, dass die Erforschung struktureller Umordnungen während der Reifung und Fusion zu einem besseren Verständnis des Eintrittsprozesses bei Klasse II-Proteinen führte (Bressanelli et al., 2004; Modis et al., 2003 und 2004; Rey, 2003).

Obwohl also die Proteine der Klasse I und II anfänglich Unterschiede in ihrer strukturellen Konformation und auf genetischer Ebene zeigen, schaffen es dennoch beide, durch ihre Strukturen die Membranfusion zu lenken und dabei gleiche physikalische Prinzipien anzuwenden. Dabei wird zunächst durch Exposition einer Fusionsschleife diese in die Wirtszellmembran integriert, wobei hydrophobe Reste als eine Art Anker fungieren, die nur teilweise in den äußeren Bilayer der Membran eindringen. Das darauf folgende Zurückklappen des Fusionsproteins, das durch eine Umordnung der α -helikalen Domänen, und nicht durch eine Rückfaltung der Sekundärstruktur zustande kommt, richtet die C-terminale Transmembrandomäne auf die exponierte N-terminale Fusionsschleife des Fusionspeptids aus, die am gleichen Ende aller bisher bekannten Fusionsproteine lokalisiert ist (Schibli und Weissenhorn, 2004; Weissenhorn et al., 2007; Carr et al., 1993; Wilson et al., 1981). Dadurch entsteht genügend Energie, um die Wirtszell- und die Virusmembran aneinander zu ziehen, was schließlich zur Membranfusion führt. Bei Klasse-II-Proteinen wird das Zurückklappen durch den reduzierten pH im Endosom induziert und ist von der Zusammenlagerung der Fusionsmonomere in Trimere begleitet. Die Konformationsunterschiede der Klasse I- und II-Proteine könnten darauf hinweisen, dass die Protein- und Membran-Restrukturierung auf unterschiedlichen Wegen ablaufen. Andererseits ließen die Ähnlichkeiten in den postfunktionalen Strukturen vermuten, dass Gemeinsamkeiten in den Fusionswegen durchaus möglich sind

(Gibbons et al., 2004; Modis et al., 2004). Letztlich wurde in Untersuchungen mit dem Dengue-E-Protein (Klasse II) und dem HA-Protein (Klasse I) von Influenza gezeigt, dass diese Proteine ähnliche Wege der Membranfusion katalysieren. Dabei ist die Fusion mechanistisch an den Übergang von einer erweiterten, homotrimeren und in beiden Membranen verankerten Konformation in eine postfusionale Haarnadelschleife gekoppelt. Außerdem kann es zu lateralen Interaktionen zwischen benachbarten Fusionsproteinen, die bereits eine Haarnadelschleife ausgebildet haben, kommen (Gibbons et al., 2004; Chernomordik und Kozlov, 2004; Plonsky und Zimmerberg, 1996; Zaitseva et al., 2005). Folglich unterscheiden sich Klasse-I und II-Proteine zwar drastisch in ihrer anfänglichen Struktur, liegen aber nach Aktivierung in ähnlichen Konformationszuständen vor. Unter Verwendung von suboptimalen pH-Werten und Fusionsinhibitoren konnte gezeigt werden, dass das E1-Intermediat der Flaviviren die gleiche Zusammenstellung an Fusionsintermediaten etabliert, wie dies beim HA-Protein der Influenzaviren der Fall ist. Während nur ein spezifisches Intermediat für das E-Protein allein gefunden wurde, ist der zweite Unterschied, dass das E-Protein erst nach einer Ansäuerung funktionale Homotrimere, im Gegensatz zur ursprünglichen, homotrimeren Form der HA-Proteine, bildet (Zaitseva et al., 2005).

Die Konformationsänderungen, die von Klasse I-Fusionsproteinen durchlaufen werden, wurden bereits in vielen Experimenten aufgeschlüsselt, indem man die Fusion verlangsamte, sie in verschiedenen Stadien durch genetisch modifizierte Proteine blockierte oder Inhibitoren verwendete (Lambert et al., 1996; Iorio und Mahon 2008; Wild und Buckland et al., 1997; Richardson und Choppin, 1983). Im Vergleich dazu sind die unterschiedlichen Änderungen der Konformation von Klasse II-Proteinen ebenso vielfach erforscht (Smit et al., 1999, McInerney et al., 2004; Staufler et al., 2008; Harrison, 2008) und immer noch Gegenstand aktueller Untersuchungen. Dabei ist die Art der Fusion, die von Klasse II-Proteinen vermittelt wird, signifikant schneller und weniger sensitiv gegenüber einer Temperaturerniedrigung (Corver et al., 2000).

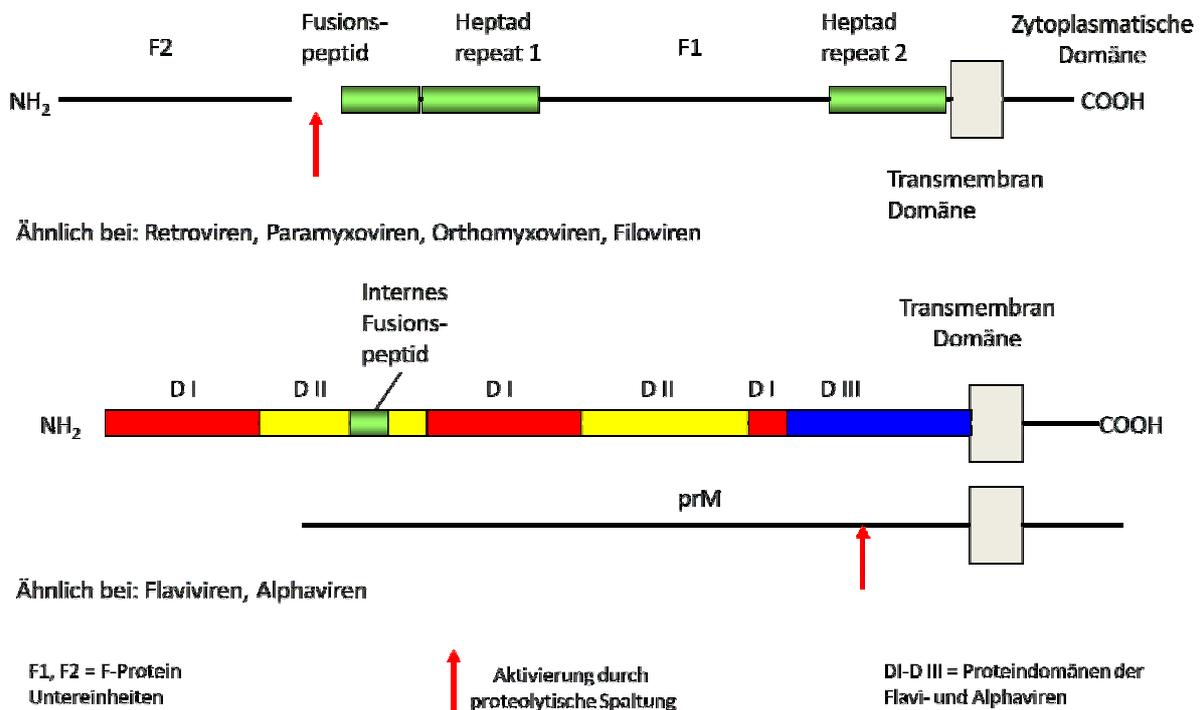


Abbildung 1.5.1: Schematischer Aufbau der Fusionsproteine der Klasse I und II. Bei Flaviviren befindet sich das Fusionspeptid innerhalb der Sequenz des E-Proteins, während es bei Paramyxoviren am aminoterminalen Ende lokalisiert ist.

1.6 Chemotherapeutische antivirale Ansätze

Prinzipiell kann eine Infektion durch Substanzen, die das „Attachment“ oder die Fusion verhindert oder blockiert, in bestimmten Maßen gehemmt werden. Die bisher erforschten Konformationsintermediate und -stadien der viralen Fusionsproteine sind essentiell für die Vermittlung der Membranfusion von Virion und Zielzelle und der damit verbundenen Virusinfektion. Nach der initialen Faltung und der Prozessierung werden die Proteine bis zum Zusammenbau im Virion und der Virusabgabe in die Umgebung in einem metastabilen Zustand gehalten. Natürlich können gerade solche Stadien als Ziele für die Entwicklung von kleinen inhibitorischen Molekülen, Antikörpern oder Peptiden dienen. Peptide, die beispielsweise bei Klasse I-Proteinen Teile der α -Helices nachahmen, inhibieren die strukturelle Umordnung des Fusionsproteins und der anschließenden Virusinfektion. 1990 zeigte Qureshi et al., dass ein Peptid, das eines der beiden Helices der HIV-1-Transmembrandomänen imitierte, die Infektiosität blockieren konnte. Kurz darauf wurde das anti-HIV1-Medikament FuzeonTM, auf Basis des Inhibitors T-20 (Enfuvirtide; Trimeris, Inc), sowie andere N- und C-helikale Inhibitorpeptide entwickelt und zugelassen (Wild et al., 1993 und 1994; Kilby et al., 1998; Hardy und Skolnik, 2004). T-20 wird erfolgreich als ein Therapeutikum gegen HIV-1-Infektionen eingesetzt, was das Konzept der Therapieentwicklung unterstützt, die auf der Aufklärung viraler Fusionsmechanismen und dem Gebrauch von Peptiden als antivirale Agentien basiert. Außerdem wurde auch in anderen Virenfamilien, wie den Orthomyxoviren, Filoviren, Paramyxoviren, Herpesviren und den Coronaviren nach inhibitorischen Peptiden, die die Struktur von Fusionsproteinen nachahmen und damit infektionshemmend auf den Viruseintritt wirken, gesucht (Lambert et al., 1996; Young et al., 1999; Watanabe et al., 2000; Bosch et al., 2003; Bultmann et al., 2002; Okazaki et al., 2004; Yao et al., 1996). Interessanterweise konnte 1997 das Fusionsprotein des New-Castle-Disease-Virus (NDV) charakterisiert und ein Peptid entwickelt werden, das aus einer Sequenz der Leucin-Zipper-Region (Heptad-Repeat-Region 2; siehe Abbildung 1.5.1) stammte. Dieser Inhibitor konnte jedoch nicht beim Viruseintritt, sondern bei der vom Virus induzierten Zell-Zellfusion hemmen. Nach weiteren Untersuchungen wurde festgestellt, dass das Peptid eine Helix bildet, an der die Leucin-Reste nur auf einer Seite lokalisiert waren (Young et al., 1997). Zur gleichen Zeit wurden Peptide veröffentlicht, die ebenfalls mit der Leucin-Zipper-Region (AS 455-490) übereinstimmten und bei MV die Fusion hemmen. Dabei konnte gezeigt werden, dass weder die Synthese noch der Transport von F an die Zellmembran, noch das Andocken des Virus an die Zelle unterbrochen, sondern der Viruseintritt in die Zelle inhibiert wurde (Wild und Buckland, 1997).

1993 wurde aufgrund der Annahme, dass Fusionsproteine der Klasse I sehr ähnliche Strukturen aufweisen, ein fusionsinhibierendes Peptid gegen eine Domäne im F₁-Protein der Paramyxoviren entwickelt, das analog zu einem Inhibitor gegen die Domäne DP-178 des HIV-1 gp41-Proteins gestaltet wurde (Lambert et al., 1996). Einige Jahre später konnte eine strukturelle Mikrodomäne im F-Protein identifiziert werden, die innerhalb der Familie der Paramyxoviren stark konserviert ist. Daher wurde templatebasierend ein kleines Molekül entwickelt, das die glykoproteininduzierte Fusion des MV spezifisch hemmt, indem das durch das F-Protein induzierte Verschmelzen der Membranen unterbunden wird (Plempner et al., 2003 und 2005). Weiterhin wurden aus einer Genbank von 137.500 potentiellen Inhibitorkandidaten 11 Inhibitoren gefunden, die den Viruseintritt hemmen und 24, die die MV-Infektion erst nach dem Zelleintritt im viralen Lebenszyklus hemmen konnten. Dabei wurden in Experimenten mit verschiedenen Stellvertretern der Paramyxoviren drei Aktivitätsschemata festgestellt: einige der Inhibitoren bestanden aus exklusiven MV-spezifischen Blockern, weitere fungierten als Inhibitoren von MV und verwandten Viren desselben Genus, wie CDV, und wieder andere Inhibitoren besaßen eine größere Reichweite, so dass sie in der gesamten Unterfamilie der Paramyxovirinae angewendet werden konnten (Yoon et al., 2008).

Ein Impfstoff gegen NiV steht zurzeit noch nicht zur Verfügung. Daher ist es umso wichtiger, potentielle Inhibitoren gegen das Nipah-Virus zu untersuchen und zu identifizieren, um dadurch mögliche Medikamentenentwicklungen voranzutreiben. Da das Nipah-Virus ein schweres Krankheitsbild hervorruft, scheinen Ansätze zur Entwicklung antiviraler Agentien mehr als sinnvoll. Es konnte bei Gabe des Basenanalogs Ribavirin eine Reduktion der Mortalität um 36 % beobachtet werden (Chong et al., 2001). Erst kürzlich wurden die Struktur und die Konformationsänderungen des F-Proteins bei der Fusion von Virus- mit

der Zellmembran untersucht und dabei eine postfusionale α -Helixbündel-Struktur identifiziert. So konnte gezeigt werden, dass ein Inhibitor, der ursprünglich gegen das F-Protein des humanen Parainfluenza-Virus 3 (hPIV3) synthetisiert wurde, sogar effektiver den durch das Hendra-Virus-(HeV)-Glykoprotein vermittelten Viruseintritt in pseudotypisierten HeV verhinderte als Peptide, die von HeV abgeleitet wurden (Porotto et al., 2006). Peptide, die aus Heptad-repeat-Region A (HRA) und Heptad-repeat-Region B (HRB) Regionen des F-Proteins abgeleitet wurden und mit F-Fusionsintermediaten wechselwirken, sind generell Kandidaten für die Hemmung des Viruseintritts und der Fusion (Bossart et al., 2006; Russell et al., 2001; Lambert et al., 1996; Rapaport et al., 1995; Yao et al., 1996). Vermutlich binden dabei von HRA-abgeleitete Peptide HRB in einem frühen Konformationsintermediat des F-Proteins und von HRB-abstammende Substanzen ein Vorstadium eines Haarnadelintermediats (Russell et al., 2001 und 2003). In beiden Fällen verhindert das Binden der HR-abgeleiteten Substanz die Ausbildung der Haarnadelschleife, die notwendig für die Membranfusion ist (Melikyan et al., 2000; Russell et al., 2001). HRB-abgeleitete Peptide sind meist kürzer, besser löslich und ca. 1.000 Mal potenter als Peptide, die von der HRA-Region abstammen (Eckert et al., 2001). Weitere c-terminal abgeleitete HR-Regionen entsprechende Peptide konnten als erfolgsversprechende Fusionsinhibitoren getestet werden (Bossart et al., 2002). Diese wurden durch Weiterentwicklungen gekürzt und verschiedenartig modifiziert, was zu höherer Löslichkeit und besserer Ausbeute, und meist auch zu gleicher, aber nicht höherer Effektivität, führte (Bossart et al., 2005). Diese Ergebnisse zeigen ein weiteres Mal, dass konservierte interhelikale Packungs-Interaktionen im F-Protein-Fusionskern ein bestimmender Faktor für Strategien zur Entwicklung inhibitorischer Peptide gegen F-Proteine der Klasse I darstellen (Porotto et al., 2007).

Auch für Klasse II-Proteine wurden in letzter Zeit einige strukturelle Intermediate identifiziert (Stiasny et al., 2007; Bressanelli et al., 2004), die dazu dienen können, Moleküle zu entwickeln, die ihre zur Fusion notwendige Flexibilität einschränken. So konnten Inhibitoren nach der „Wimley-White Interfacial Hydrophobicity Scale“ auf der Basis von Peptiden synthetisiert werden, die die Struktur der Fusionsproteine teilweise nachahmen (WWIHS; White et al., 2003). Dabei konnten 5 Domänen mit einer signifikanten WWIHS-Punktzahl ermittelt werden, die aus der Fusionspeptid-Domäne, einem Teil der Subdomäne II b, dem Verankerungsstamm nach Domäne III und der Transmembrandomäne bestehen. Dabei konnte letztlich das bis zu 99 % infektionsinhibierende Peptid DN59 identifiziert werden, das nicht toxisch und sehr sequenzspezifisch ist (Hrbobowski et al., 2005). Somit könnte DN59 zur Weiterentwicklung weiterer Inhibitoren bzw. als Basis zur Herstellung von Medikamenten dienen. 2008 wurde in einer Untersuchung festgestellt, dass Fukoidan, ein schwefelsaures Polysaccharid der marinen Alge *Cladosiphon okamuranus* die Dengue-Infektion des Serotyps 2, aber nicht der anderen Serotypen, inhibieren kann (Hidari et al., 2008).

1.7 Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit sollten drei Hauptthemen bearbeitet werden:

Zum einen galt es den Fusions-Inhibitionsmechanismus des monoklonalen Antikörpers K41, der das Tetraspanin CD9 bindet, aufzuklären. Dieser wurde 1997 in Versuchen zur Identifizierung des zellulären Rezeptors isoliert und inhibierte die CDV-Infektion verschiedener Zelllinien (Löffler et al., 1997). Nachdem keine direkte Bindung von CDV an CD9 nachgewiesen werden konnte, konnte schließlich gezeigt werden, dass anti-CD9 Antikörper ausschließlich die Virus-induzierte Zell-Zellfusion blockieren, während die Virus-Zellfusion nicht beeinflusst wird (Löffler et al., 1997; Schmid et al., 2000). Zusätzlich konnte 2006 gezeigt werden, dass die Empfindlichkeit von CDV gegenüber CD9-Antikörpern mit dem H-Protein des Virus gekoppelt ist (Singethan et al., 2006).

Als zweites sollte ein Testsystem für die Paramyxovirus-Fusion von MV, CDV und NiV etabliert werden, um die Testung kleiner Moleküle zu ermöglichen. Obwohl ein attenuierter Lebendimpfstoff für MV existiert, ist die Impfeffizienz, besonders bei Kleinkindern aufgrund der Wechselwirkung mit maternalen AK sehr gering (Garenne et al., 1991; Aaby et al., 1993). Zusätzlich tragen Impfbedenken der Eltern besonders in Industrieländern dazu bei, dass die Durchimpfungsraten abnehmen und MV-Epidemien immer noch sehr

aktuell sind. Daher ist die Entwicklung von neuen antiviralen Medikamenten, die die Lücke bei Kindern zwischen 9 und 15 Monaten bis zum Impfalter schließen und Virusausschläge eindämmen können, mehr als notwendig. Letztlich stehen im Falle einer SSPE-Erkrankung bis heute noch keine Behandlungsmöglichkeiten zur Verfügung. Zum anderen bleibt trotz der Existenz einer attenuierten Lebendimpfung gegen das Hundestaube-Virus (CDV) dieses Virus das wichtigste Pathogen von Hunden weltweit. Es ist außerdem eine antigenische Heterogenität des H-Proteins zwischen WT- und Vakzine-Viren festgestellt worden (Chan et al., 2008; Pardo et al., 2005; Kapil et al., 2008). Somit werden die derzeitigen Impfstoffe wohl nicht mehr lange als Schutz gegen die heutzutage zirkulierenden CDV-Stämme schützen, da das H-Protein als CDV-Antigen die Basis heutiger Impfstoffe darstellt. Überdies steht ein Impfstoff gegen NiV zurzeit noch nicht zur Verfügung. Daher ist es umso wichtiger, potentielle Inhibitoren gegen das Nipah-Virus zu untersuchen und zu identifizieren, um dadurch mögliche Medikamentenentwicklungen voran zu treiben. Da das Nipah-Virus ein schweres Krankheitsbild mit Symptomen von Lungenentzündung und Enzephalitiden hervorruft, scheinen Ansätze zur Entwicklung antiviraler Agentien mehr als sinnvoll.

Letztlich galt es, ein Testsystem für die DENV-Virusaufnahme zu entwickeln und somit die Testung kleiner Inhibitoren zu ermöglichen. Da Dengue-Viren als BSL-3-Erreger eingestuft werden, aber noch keine effektiven Vakzine oder ein antivirales Medikament gegen den Eintritt oder den Fusionsprozess vorhanden sind, ist die Behandlung bisher rein symptomatisch. Deshalb ist die Testung und Herstellung inhibitorischer Substanzen dringend erforderlich.

2 Material

2.1 Zellen

Zelllinie	Zelltyp	Herkunft
Vero	Fibroblast (Niere)	afrikan. grüne Meerkatze (Chlorocebus aethiops)
Vero-SLAM	Fibroblast, stabil mit humanem SLAM transfiziert	afrikan. grüne Meerkatze (Chlorocebus aethiops)
CHO-K1	Epithelzelle (Ovar)	chinesischer Hamster
CHO-CD46	stabil mit CD46 transfiziert	chinesischer Hamster
CHO-SLAM	stabil mit humanem CD150 transfiziert	chinesischer Hamster
CHO-CD9	mit humanem CD9 transfiziert	chinesischer Hamster
CHO-Mock	CD9-negativ, nicht transfiziert	chinesischer Hamster
HeLa	Epithelzellen des Zervixkarzinoms	Mensch (Homo sapiens)
HUVEC	primäre Endothelzellen der Nabelschnurvene	Mensch (Homo sapiens sapiens)
293T	Nierenfibroblast, transfiziert mit T-Antigen von SV40	Mensch (Homo sapiens)
SF9	immortalisierte Insekten-Zelllinie aus Ovar-Zellen	Spodoptera frugiperda (Nachtfalter)
C6/36	Gewebe-Zellen aus der Larve	Aedes albopictus (Moskito)
S2	Drosophila Schneiderzellen (spätes Embryostadium)	Drosophila melanogaster (Fruchtfliege)
Hybridom HB-46	B-Zellen mit Myelomzellen fusioniert; AK gegen DENV 2	Maus
Hybridom 38/87	B-Zellen mit Myelomzellen fusioniert; AK gegen Moesin	Maus
Hybridom K41	B-Zellen mit Myelomzellen fusioniert; AK gegen CD9	Maus

Tabelle 2.1.1: Übersicht über die verwendeten Zellarten und deren Herkunftsspezies.

Die CHO-Transfektante CHO-CD46 (CHO-5.3) wurde von Dr. B. Loveland, The Austin Research Institute, Australien, zur Verfügung gestellt. Die CHO-Transfektanten CHO-Mock und CHO-CD9 wurden von Prof. Dr. François Lanza, Etablissement de Transfusion Sanguine de Strasbourg, Strasbourg/ France, zur Verfügung gestellt. Die Transfektanten Vero-SLAM und CHO-SLAM stammen von Dr. Yusuke Yanagi, Department of Virology, Faculty of Medicine, Kyushu University, Japan. Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene, sogenannte *Human umbilical vein endothelial cells* (HUVEC), wurden frisch isoliert. Die hierfür nötigen Nabelschnüre wurden mit Genehmigung und freundlicher Unterstützung des Kreißaalteams der Frauenklinik der Universität Würzburg in anonymisierter Form bereitgestellt.

Alle anderen Zelllinien standen am Institut für Virologie und Immunbiologie in Würzburg zur Verfügung.

2.2 Viren

Virus-Stamm	Typ
CDV-OND-LP	Variante der Onderstepoort Vakzine
MV-IC323-eGFP	GFP-markiertes MV-WT-Virus; S2-Pathogen
Dengue Virus Serotyp 1 - 4	WT Virus der verschiedenen Serotypen 1 - 4; S3 - Pathogen.
MV-Edm	Laborstamm Edm B Vaccine/60s
NIV (Nipah Virus)	WT-Isolat aus humanem Hirngewebe, von Dr. J. Cardoso, Malaysia; S4-Pathogen

Tabelle 2.2.1: Übersicht über die verwendeten Virusstämme.

Die CDV-Stämme wurden von Prof. Dr. B. Rima, The Queen's University of Belfast, Belfast/ UK, zur Verfügung gestellt. Einer der wichtigsten Laborstämme ist der Onderstepoort-Stamm, der weltweit als attenuierte Lebendvakzine verwendet wird. Er geht zurück auf ein Isolat, das während einer Epidemie unter Füchsen in amerikanischen Zuchtfarmen um 1930 gewonnen wurde. Dieses wurde dann über einen längeren Zeitraum in Frettchen passagiert und auf Hühnereier adaptiert, wobei es hier viele Male weiterpassagiert wurde. Danach wurde das attenuierte Virus als Onderstepoort bezeichnet und aufgrund seiner kompletten Apathogenität im Tiermodell ab 1960 als Lebendvakzine eingesetzt (Haig et al., 1948, Appel und Gillespie, 1972). Der Stamm Onderstepoort „Large Plaque“ (OND-LP) ist ein an Vero-Zellen adaptierter Klon des Onderstepoort Impfstammes. Er zeigt kaum Abweichungen auf genomischer Ebene und unterscheidet sich hauptsächlich in der Größe der in Zellkultur gebildeten Synzytien.

Der attenuierte Masernvirusstamm Edm war am Institut für Virologie und Immunbiologie in Würzburg verfügbar. Der Impfvirusstamm Edm B Vaccine/60s war bisher über Vero-Zellen passagiert worden. Das virulente, GFP-markierte WT Masernvirus IC323 wurde freundlicherweise von Dr. Yusuke Yanagi, Department of Virology, Faculty of Medicine, Kyushu University, Japan zur Verfügung gestellt.

Die virulenten Serotypen 1 - 4 des Dengue Virus wurden mit freundlicher Genehmigung von Dr.med. Jonas Schmidt-Chanasit, Abteilung Virologie des Bernhard-Nocht-Instituts für Tropenmedizin, Freie und Hansestadt Hamburg, zur Verfügung gestellt. Da sie als BSL-3-Pathogen eingestuft sind, wurden sie im Institut für Virologie in Würzburg ausschließlich im BSL-3-Labor verwendet.

Das virulente Nipah-Virus-Isolat ist als BSL-4-Pathogen klassifiziert und konnte daher nicht im Institut für Virologie und Immunologie Würzburg verwendet werden. Daher wurden alle Versuche im BSL-4-Labor der Philipps-Universität Marburg, Institut für Virologie, mit freundlicher Genehmigung und Unterstützung von PD Dr. Andrea Maisner und Dr. Sandra Diederich durchgeführt.

2.3 Bakterien

Zur Vermehrung der Plasmide, die in den Transfektions-Assays verwendet wurden, wurden die gram-positiven *E.coli* Bakterien XL10-Gold von Invitrogen benutzt. Für größere Plasmide ab einer Größe von ca. 8 KB wurden die grampositiven *E.coli* Bakterien Top 10 mit TB-Medium verwendet. Als methylierungs-sensitive *E.coli*-Bakterien wurde der Stamm INV 110 verwendet.

2.4 Plasmide

Plasmid	Typ
pCG-CDV-H	pCG-Vektor, in den das H-Gen von CDV-OND (LP) kloniert wurde.
pCG-CDV-FL	pCG-Vektor, in den das F-Gen von CDV-OND (LP) kloniert wurde.
pCG-H5	pCG-Vektor, in den das H-Gen von MV (Edm) kloniert wurde.
pCG-F1	pCG-Vektor, in den das F-Gen von MV (Edm) kloniert wurde.
pCz-CFG5-NIV-F	pczCFG5-Vektor, in den das F-Gen von NIV kloniert wurde.
pCz-CFG5-NIV-Gtag	pCz-CFG5-Vektor, in den das G-Gen von NIV kloniert wurde.
pCz-CFG5-NIV-Ftag2	pCz-CFG5-Vektor, in den das F-Gen von NIV kloniert wurde, das durch tag markiert wurde und ein GFP enthält.
pCz-CFG5-NIV-Gtag	pCz-CFG5-Vektor, in den das G-Gen von NIV kloniert wurde, das durch tag markiert wurde und ein GFP enthält.
pMT-DV2-4	pMT-Vektor mit Metallothioninpromotor, in den jeweils das komplette E-Gen der DENV Serotypen 2 - 4 kloniert wurde.
pCG-DV1-4	pCG-Vektor, in den jeweils das komplette E-Gen der DENV Serotypen 1-4 kloniert wurde.
pCG-eGFP-DV3-E-N	EGFP markierter pCG-Vektor, in den der N-terminale Teil des E-Gens von DENV 3 kloniert wurde.
pczi MEA	pczi Plasmid, in das das Env-Gen von MuLV kloniert wurde
pCG-eGFP-DV3-E-Bi	EGFP markierter pCG-Vektor, in den der N-terminale Teil des E-Gens von DENV 3 sowie die zytoplasmatischeSchwanzregion von MuLV-ENV kloniert wurde.
pCG-eGFP-DV3-E-Tri	EGFP markierter pCG-Vektor, in den der N-terminale Teil des E-Gens von DENV 3, die zytoplasmatischeSchwanzregion von MuLV-ENV und die C-terminale Region des E-Gens von DENV 3 kloniert wurde.
pczCFG2fEYFPf	pcz-Vektor, in den die EYFP-Fluoreszenz kloniert wurde.
pCD9	pRC-CMV-Vektor, der das komplette CD9-Molekül exprimiert.
pCD81	pRC-CMV-Vektor, der das komplette CD81-Molekül exprimiert.
pCD82	pRC-CMV-Vektor, der das komplette CD82-Molekül exprimiert.
p9 x 81	pRC-CMV-Vektor, der die extrazelluläre Schleife 1 des CD9 Moleküls und die extrazelluläre Schleife 2 des CD81-Moleküls exprimiert.

Plasmid	Typ
p9 x 82	pRC-CMV-Vektor, der die extrazelluläre Schleife 1 des CD9 Moleküls und die extrazelluläre Schleife 2 des CD82-Moleküls exprimiert.
p81 x 9	pRC-CMV-Vektor, der die extrazelluläre Schleife 1 des CD81-Moleküls und die extrazelluläre Schleife 2 des CD9-Moleküls exprimiert.
p82 x 9	pRC-CMV-Vektor, der die extrazelluläre Schleife 1 des CD82 Moleküls und die extrazelluläre Schleife 2 des CD9-Moleküls exprimiert.
p82 x 9 x 82	pRC-CMV-Vektor, der nur den extrazellulären Teil der extrazellulären Schleife 1 des CD9 Moleküls und den intrazellulären und cytoplasmatischen Teil der extrazellulären Schleife 1 sowie die extrazelluläre Schleife 2 des CD81-Moleküls exprimiert.
pczVSV-G	pcz-Vektor, in den das G-Gen von VSV kloniert wurde.
pHIT60	pHit60-Vektor (MoMuLV-gag-pol-Expressionsplasmid).
pDSRed 2-C1	pDSRed-Vektor, dessen C-Terminus verwendet werden kann, um Fusionskonstrukte herzustellen.
pcz-CFG-fEYFP	pcz-Vektor, in den das EYFP-Gen kloniert wurde.

Tabelle 2.4.1: Übersicht über die verwendeten Plasmide.

Die verwendeten Plasmide pCG-CDV-H und pCG-CDV-FL wurden freundlicherweise von Prof. Dr. B. Rima, The Queen's University of Belfast, Belfast/ UK, zur Verfügung gestellt.

Die Plasmide pczCFG5-NiV-F und G stammen ursprünglich von Dr. M Czub, Winnipeg/ Kanada, während die pczCFG5-NiV-Ftag und pczCFG5-NiV-Gtag von Markus Moll, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg, hergestellt wurden. Diese Vektoren wurden uns von PD Dr. Andrea Maisner, Institut für Virologie der Philipps-Universität Marburg zur Verfügung gestellt.

Die Vektoren pMT-DV1/5', pMT-DV2/5', pMT-DV3/5' und pMT-DV4/5' sowie pTOPO-DV2/3', pTOPO-DV3/3' und pTOPO-DV4/3' konnten mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Philippe Desprès, Institut Pasteur Paris, Paris/France verwendet werden. Sie basieren auf einem Drosophila MT Promotor, der hohe, induzierbare Expressionsniveaus der Gene, die von Interesse sind, in Drosophila S2 Zellen erlaubt. Der pMT-Promotor ist durch die Zugabe von Kupfersulfat oder Cadmium-Chlorid in das Zellkulturmedium (Bunch et al., 1988) aktivierbar. Da die erhaltenen pMT-Promotoren leider nicht die komplette prM-E-Sequenz der verschiedenen Serotypen enthielten, wurden von Ben Grosse-Siestrup im Rahmen einer Diplomarbeit die fehlenden 3' Enden aus den p-TOPO-Vektoren isoliert und in pMT-DV2/5', pMT-DV3/5' und pMT-DV4/5' kloniert. Die daraus resultierenden Vektoren enthielten die komplette prM+E-Sequenz von Serotyp2-4 und wurden pMT-DV2-4 genannt.

Die chimären Expressionsplasmide p9 x 81, p9 x 82, p81 x 9, p82 x 9, p82 x 9 x 82 sowie die Vektoren pCD81, pCD9, pCD82 wurden von Dr E. Rubinstein, INSERM, Villejuif, France zur Verfügung gestellt.

2.5 Nukleotide und siRNAs

Folgende Mono- oder Oligonukleotide und DNA-Standard-Marker fanden Verwendung:

dNTP Mix 10 mM	Fermentas
GeneRuler™ 100 bp DNA Ladder	Fermentas
GeneRuler™ 1 kb DNA Ladder	Fermentas
Pageruler™ Prestained Protein Ladder;	Fermentas
Oligo (dT) ₁₅ Primer	Promega

Folgende siRNAs wurden in den Versuchen verwendet Control siRNA (anti-GAPDH)	Ambion
Nicht funktionelle Kontroll-siRNA 1 (siRNA Starter Kit) siRNAs gegen EWI-F (Target Gensymbol: PTGFRN)	Ambion
siRNA-1ID 147749 50/30 GCCCGUUUUUAUAACUGGtt)	Ambion
siRNA-2 ID 147750 50/30 CCUCAGGUCCUAUAUUUAAtt	Ambion
siRNA-3 ID 147748 50/30 GGCCACUACAAAUGUUCAAtt	Ambion

2.6 Primerpaare

Dengue Primer für site-directed Mutagenese, um BamHI Schnittstelle zu zerstören:

DV2mut-bamk.o.fw-Primer

5' AGC CTG GGA TTC TGG ATT CCT GGG AGG AGT G 3' (31mer)

DV2mut-bamk.o.rev-Primer

5' CAC TCC TCC CAG GAA TCC AGA ATC CCA GGC T 3' (31mer)

Primer zum Sequenzieren und Kontrollieren der Klonierungen im pCG-und pCG-eGFP-Vektor:

pCG-sequenzDVfw-Primer

5' TAT ACA CTG TTT GAG ATG AGG 3' (21mer)

pCG-Vektor Sequenzierprimer fw

5' GTG CTG GTT ATT GTG CTG TCT CAT C 3' (25mer)

pCG-Vektor Sequenzierprimer rev

5' TGA CCT CTT TAT AGC CAC CTT TGT T 3' (25mer)

Dengue Primer zur Isolation des E-Proteins aus dem Virusgenom mit Hilfe einer PCR:

Den01mutisoenv-fw-Primer

5' TTT TGC TGA TGC TGG TAA CTG GAT CCA TGG CCA TGC GGT GCG 3' (42mer)

Den01mutisoenv-rev-Primer

5' TTG GTG ACA AAA ATG CCG GAT CCA CAT TTG AGT TCT CTG CC 3' (41mer)

Den02mutisoenv-fw-Primer

5' AAC GAC GCA TTT CCA AAG GAT CCT GAT ATT CAT CCT AC 3' (38mer)

Den02mutisoenv-rev-Primer

5' AGT TCT TTG TTC TTC CGG ATC CCA ACG CAA CCA CTA T 3' (37mer)

Den03mutisoenv-fw-Primer

5' ATA CTA TTA ATG CTG GTT ACC GGA TCC ATG ACA ATG AGA TGT G 3' (43mer)

Den03mutisoenv-rev-Primer

5' ATT GCT CTG TCC AGG TGG GAT CCT CAT TAG TGA CGA AAA TTC C 3' (43mer)

Den04mutisoenv-fw-Primer

5' TTA TAT GAT TGG GCA AAC AGG GAT CCA GCG AAC TGT CTT CTT TGT CC 3' (47mer)

Den04mutisoenv-rev-Primer

5' TTG TCA ACC ACA AAA ATT CCG GAT CCA CAC TTC AAT TCT TTC CC 3' (44mer)

Dengue Primer zur Isolation der N-terminalen Dengue Serotyp 3 E-Proteinregion mit Hilfe einer PCR:

Primer 1: DV-3 E for SacI und BamHI

5' CAC CGA GCT CGG GGA TCC GCG GCC GCC ACC ATG AAG TTA TGC ATA TTA CTG 3' (51mer)

Primer 2: DV-3 E Rev 652 KpnI

5'CCT AGG TAC CTA TCC AGG TTA AGA GGA C 3' (28mer)

Primer 2A: DV-3 E Rev 652 KpnI und BamHI

5'CCT AGG ATC CTC AGG TAC CTA TCC AGG TTA AGA GGA C 3' (37mer)

Primer zur Isolation des zytoplasmatischen Endes von MuLV-ENV:

Primer 3: Mu Le V-Cyt For Kpn I

5' CAC CGG TAC CAA TCG ATT GGT CCA ATT TGT TAA AG 3' (35mer)

Primer 4: Mu Le V-Cyt Rev Pac I und sac II

5' CCT ACC GCG GCT TAA TTA ATG GCT CGT ACT CTA TGG G 3' (37mer)

Primer 4A: Mu Le V-Cyt Rev Bam HI

5' CCT AGG ATC CTC ATG GCT CGT ACT CTA TGG G 3' (31mer)

Primer zur Sequenzierung von Inserts im pDSRed 2-C1 Vektor:

pDSRed seq fw

5' AAG CTG AAG GAC GGC GGC CAC 3' (21mer)

pDSRed rev

5' ATT TTA TGT TTC AGG TTC AGG GGG AGG 3' (27mer)

2.7 Nährmedien und Seren

Als Nährmedien und Seren wurden folgende Substanzen und Produkte verwendet. Teilweise wurden die Medien auch selbst im Institut für Virologie und Immunbiologie in Würzburg hergestellt:

ECGS (Endothelial cell growth supplement from bovine neural tissue), Sigma

Einbettmedium Fluoromount-G™, Biozol

Einfriermedium (90 % (v/v) FKS und 10 % (v/v) DMSO), Inst. für Virologie und Immunbiologie Würzburg

FKS (Fötales Kälberserum) (Art.-Nr. S0115), Biochrom

Heparin 25000 U (Art.-Nr. H-3149), Sigma

LB-Medium: 10 g/L Bacto-Trypton, AppliChem; 5 g/L Hefe-Extrakt, Difco; 10 g/L NaCl, AppliChem; 15 g/L Agar; Difco

Leibovitz-Medium mit L-Glutamin, Sigma

Medium 199 mit Earle-Salzen, L-Glutamin und 25 mM HEPES (Art.-Nr. 22340-020) , Gibco

MEM und MEM 2 x, Inst. für Virologie und Immunbiologie Würzburg

NaHCO₃ (Natriumhydrogencarbonat) 5,6 % (w/v), Inst. für Virologie und Immunbiologie Würzburg

Natriumpyruvat 100 mM, Sigma

Overlay-Agar (25 % (v/v) MEM mit 5 % (v/v) FKS, 37,5 % (v/v) Agar 2 % (w/v), 37,5 % (v/v) MEM 2 x)

RPMI 1640, Inst. für Virologie und Immunbiologie Würzburg

SF-900 II Medium mit L-Glutamin, Gibco

Schneiders Drosophila Medium, Gibco

SOC-Medium (20 g/l Bacto-Trypton, AppliChem; 5 g/l Hefe-Extrakt, Difco; 0,5 g/l NaCl, AppliChem; 2,5 ml 1M KCl, Merck; mit a.dest. auf 970 ml auffüllen; nach dem Autoklavieren: 10 ml 1 M MgCl₂ (steril), Ferak; 20 ml 1 M Glucose (steril), Ferak)

TB-Medium (12 g/l Bacto-Trypton, AppliChem; 24 g/l Hefe-Extrakt Difco; 4 ml Glycerol, Sigma; KHPO₄-Lösung (0,17 M KH₂PO₄ + 0,72 M K₂HPO₄), Ferak, Merck; 9 Teile TB-Medium mit einem Teil KHPO₄ direkt vor Verbrauch vermischt)

2.8 Lösungen und Puffer

a.dest	Inst. für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
Blockierpuffer	(5 % (w/v) Magermilchpulver ad PBS ⁽⁻⁾ 0,05 % Tween)
DEPC-H ₂ O	(0,1 % (v/v) Diethylpyrrolidinium-carbonat in a. dest.)
DNA-/RNA-Farbpuffer 10x	(50 % (v/v) Glycerin, 0,4 % (v/v) Bromphenolblau, 0,4 % (v/v) Xylencyanol FF ad a. dest.)
Einfriermedium	FKS, 10 % DMSO
Elutionspuffer	(0,1 M Glycin-HCl ad a. dest. und pH 2,7)

Extraktionslösung (MTT-Test)	0,4 g SDS und 0,87 ml 1 M HCl in 8,75 ml 100 %igem DMSO gelöst
FACS-Puffer	(0,4 % (w/v) BSA, 0,02 % (w/v) Natriumazid in 1000 ml PBS ⁽⁻⁾)
5X first-strand buffer	[250 mM Tris-HCl (pH 8,3), 375 mM KCl, 15 mM MgCl ₂]; Promega
Glutaraldehyd-Sörensenphosphatpuffer	6,25 % in 50 mM Phosphatpuffer
HEPES	Carl Roth
Kristallviolett (Gentian Violett)	ICN Biochemicals
Kupfer-II-Sulfat (500 mM-Lösung in a.dest)	Sigma
MTT-Lösung	12,5 mg Tetrazolium-Salz MTT in 5 ml PBS gelöst
Neutralrotlösung 1,6 % (w/v)	Inst. für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
NP40-Lysispuffer	(1,0 % (v/v) NP-40-Alternative 125 mM NaCl, 50 mM HEPES, 1 mM EDTA sowie 1 Tablette Proteaseinhibitor pro 50 ml Endvolumen ad a.dest. und pH 7,4)
Paraformaldehyd 3,7 % (w/v)	(37 g Paraformaldehyd in 1000 ml PBS ⁽⁻⁾ oder PBS) PBS, PBS ⁽⁻⁾ Inst. für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
4 x Probenpuffer (reduzierend)	(25 ml 1 M Tris, 20 ml β- Mercaptoethanol, 40 ml Glycerol, 9,2 g SDS, 4 ml 0,1 % Bromphenolblau ad a.dest 100 ml und pH 6,8)
4 x Probenpuffer (nicht reduzierend)	(25 ml 1 M Tris, 40 ml Glycerol, 9,2 g SDS, 4 ml 0,1 % Bromphenolblau ad a.dest 100 ml und pH 6,8)
Proteingellaufpuffer 10 x	(3,03 % (w/v) Tris Base, 14,4 % (v/v) Glycin, 1,0 % (w/v) SDS ad a.dest.)
Für die Plasmidpräparation:	
Sol A	50 mM Glucose, 25 mM Tris-HCl, 10 mM EDTA (pH 8,0)
Sol B	0,2 N NaOH, 1 % SDS - frisch ansetzen
Sol C	3 M K-Acetat, 1,8 M Eisessig
Sörensen-Phosphatpuffer	Lsg. A: 100 mM KH ₂ PO ₄ Lsg. B: 100 mM Na ₂ HPO ₄
TAE-Puffer	(2 M Tris, 0,57 % (v/v) Essigsäure, 0,6 M EDTA ad a. dest. und pH 8,0)
TBS-Puffer	(25 mM Tris-HCl, 150 mM NaCl ad a.dest. und pH 7,4)

TFB I	(10 mM CaCl_2 , 15 % (v/v) Glycerin; 30 mM Kaliumacetat pH 5,8, 100 mM Rubidiumchlorid; 50 mM Manganchlorid)
TFB II	(10 mM MOPS pH 7,0; 10 mM Rubidiumchlorid; 75 mM CaCl_2 ; 15 % Glycerin)
Triton X-100 0,1 % (v/v)	(1 ml Triton X-100 in 1000 ml $\text{PBS}^{(-)}$ oder PBS)
Waschpuffer A	(20 mM NaH_2PO_4 , 20 mM NaHPO_4 ad a.dest. und pH 7,4)
Western-Blot-Puffer I	(0,3 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol ad a.dest. und pH 10,4)
Western-Blot-Puffer II	(0,025 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol ad a.dest. und pH 7,4)
Western-Blot-Puffer III	(0,025 M Tris-HCl, 20 % (v/v) Methanol, 0,04 M Aminocaprinsäure ad a. dest. und pH 9,4)

2.9 Antikörper

2.9.1 Primärantikörper

Antikörper (Subtyp)	Spezifität	Herkunft/Typ	Hersteller
K41 (IgG1)	CD9	M/m	AG JSS
9E2	CDV-H	M/m	AG JSS
Dog HI-Serum	CDV	D/p	Gabe von M. Appel
HB46	DENV Serotyp 2	M/m	ATCC
α -Denguecomplex, pan	DENV Serotyp 1-4	M/p	US Biological
α -Ewi-F	Ewi-F	M/m	Gabe von E. Rubinstein
38/87	Moesin	M/m	Gabe von R. Schwartz-Albiez
ALB6	CD9	M/m	Abcam
MM2/57	CD9	M/m	Abcam
H110 (Sc-9148)	CD9	K/p	Santa Cruz
α -GAPDH	GAPDH	M/m	Acris Antibodies
Nghia-Serum	DENV 2	H/p	Diagnostik Virologie Würzburg
SSPE-HI-Serum	MV	H/p	Diagnostik Virologie Würzburg
MM2/57	CD9	M/m	Serotec
anti-CD63	CD63	M/m	Gabe von Dr. F. Lanza
Z81.1	CD81	M/m	Gabe von Dr. F. Lanza
anti-CD53	CD53	M/m	Gabe von Dr. F. Lanza
Z82.2	CD82	M/m	Gabe von Dr. F. Lanza
A504	MV-F	M/m	AG JSS

Tabelle 2.9.9.1: Übersicht der verwendeten Primärantikörper und Seren; M: Maus; D: Hund; H: Mensch; K: Kaninchen, m: monoklonal; p: polyklonal.

Alle verwendeten monoklonalen Antikörper gegen CDV-Antigene, gegen Moesin und der mAK K41 wurden als Hybridom-Antikörper aus der Maus hergestellt und in der Durchflußzytometrie sowie in der Immunfluoreszenz in einer Verdünnung von 1 : 100 eingesetzt. Der HB46-AK wurde mit Hilfe der Hybridomzellen HB-46 der Firma ATCC hergestellt und 1 : 200 eingesetzt. Das DENV 2-Serum wurde im Institut für Virologie und Immunologie Würzburg in der Diagnostik von einem Mitarbeiter des Instituts zur Verfügung gestellt, während das masernviruspezifische Hyperimmunserum von einem an SSPE-Erkrankten gewonnen wurde.

2.9.2 Sekundärantikörper

Kaninchen anti Maus IgG (Fc), FITC	DAKO
Ziege anti Maus IgG (H+L)-Alexa 594	Molecular Probes
Ziege anti Maus IgG (H+L)-Alexa 488	Molecular Probes
Ziege anti Human IgG (H+L)-Alexa 488	Molecular Probes
Kaninchen anti dog FITC	DAKO
Cy TM 2-conjugated Goat anti-mouse IgG Fcy	Dianova
Ziege anti Kaninchen IgG (H+L)-Alexa 488	Molecular Probes
Ziege-anti-Maus-IgG (H+L)-HRPO	Dianova
Ziege-anti-Maus-Ig-F(ab') ₂ -Fragment-RPE	Molecular Probes
Streptavidin, HRP conjugated	Millipore (CHEMICON/Upstate/Linco)

2.9.3 Direkt markierte Substanzen

Alexa Fluor [®] 488 Phalloidin	Molecular Probes
CD29 (β_1 -Integrin)-Alexa 647	Serotec
α -CD9 [MM2/57] (Biotin)	Abcam
α -CD9-FITC Klon ML13 IgG1	Becton Dickinson
α -human-CD9-p24-FITC Klon p1/33/2	DAKO
α -CD9-PE	Becton Dickinson

2.9.4 Fluoreszenzfarbstoffe

4', 6-Diamidino-2-Phenylindoldihydrochlorid (DAPI)	Molecular Probes
--	------------------

2.10 Chemikalien, Enzyme und Peptide

2.10.1 Enzyme

Alkalische Phosphatase (CIP)	Fermentas
Klenow-Polymerase	Fermentas
Taq-DNA-Polymerase	Fermentas
λ -Exonuclease	Biolabs
Ligase	Fermentas
SuperScript [™] II Reverse Transcriptase	Promega
PFU Ultra [™] High-Fidelity DNA Polymerase	Stratagene

2.10.2 Restriktionsenzyme

ApaI	Fermentas
Bam HI	Fermentas
Cla I	Fermentas
Eco R I	Fermentas
Eco R V	Fermentas
Eco 47III	Fermentas
Kpn I	Fermentas
Nhe I	Fermentas
Sac I	Fermentas
Sac II	Fermentas
Sal I	Fermentas
SphI	Fermentas
Xba I	Fermentas
Xho I	Fermentas

2.10.3 Chemikalien

Acrylamid 4K-Lösung 30 % (Art.-Nr. A1672)	AppliChem
Agar 2 % (w/v) (2,0 g Bacto™ Agar ad 100 ml a. dest.; Autoklavierung)	Inst. für Viro- und Immunbiologie, Würzburg,
UltraPure™ Agarose (Art.-Nr. 15510-027)	Invitrogen
Aminocaprinsäure (Art.-Nr. S-2504)	Sigma
Ammoniumpersulfat (Art.-Nr. A-3678)	Sigma
Bacto™ Agar (Art.-Nr. 214010)	Becton Dickinson
Bicinchoninsäurelösung (Art.-Nr. B-9643)	Sigma
β-Mercaptoethanol (Art.-Nr. M-7154)	Sigma
Bromphenolblau (Art.-Nr. A3640)	AppliChem
BSA (Fraktion V) (Art.-Nr. 160069)	ICN Biomedicals
1-Butanol (Art.-Nr. A3066)	AppliChem
Ciprofloxacin (Ciprobay®)	Bayer
DABCO (Art.-Nr. D-2522)	Sigma
DEPC (Art.-Nr. D-5758)	Sigma
DTT, DL-Dithiothreitol 100 mM (Art.-Nr. P1171)	Promega
EDTA (Art.-Nr. E-6758)	Sigma
Essigsäure (Art.-Nr. A0820)	AppliChem

Entwicklungs- und Fixierlösung	Hartenstein
Ethanol absolut (Art.-Nr. A3693)	AppliChem
Ethidumbromidlösung 500 µg/ml (Art.-Nr. E-1385)	Sigma
Gelatin, Typ A, aus Schweinehaut (Art.-Nr. G-2500)	Sigma
Glutardialdehyd (~50 % (v/v) in Wasser) (Art.-Nr. 4995.1)	Carl Roth
Glycerin (Art.-Nr. 00749)	Ferak Laborat
Glycin (Art.-Nr. A1377)	AppliChem
Kanamycin	AppliChem
Kombinationslösung aus 100 mg/ml Penicillin und 100 mg/ml Streptomycin in a. dest. in Portionen zu 1,2 ml	Inst. für Viro- und Immunbiologie, Würzburg
Kupfer-II-Sulfat-Lösung 4 % (w/v) (Art.-Nr. B-2284)	Sigma
Magermilchpulver	Fluka® Analytical
Methanol (Art.-Nr. 106009)	Merck
Natriumazid (Art.-Nr. S-2002)	Sigma
Natriumbutyrat	Sigma
Natriumchlorid (Art.-Nr. A2942)	AppliChem
Natriumhydrogenphosphat (Art.-Nr. 6346)	Merck
Natriumdihydrogenphosphat (Art.-Nr. 01143)	Ferak Laborat
Natriumhydroxid-Maßlösung 1 M (Art.-Nr. A1432)	AppliChem
NP-40-Alternative (Art.-Nr. 492016)	Calbiochem
Complete Protease Inhibitor Cocktail Tablets (Art.-Nr. 11873580001)	Roche
Paraformaldehyd (Art.-Nr. A3813)	AppliChem
Polyethylenimine (PEI)25K, (Art.-Nr. 23966)	Polyscience Inc., Warrington PA
Protein-G-Sepharose™ 4 Fast Flow (Art.-Nr. 17-0618-01)	GE Healthcare
Proteinstandardlösung 1,0 mg/ml (Art.-Nr. P-0914)	Sigma
Salzsäure-Maßlösung 1 M (Art.-Nr. A1434)	AppliChem
Natriumdodecylsulfat (Art.-Nr. L-3771)	Sigma
TEMED (Art.-Nr. T-9281)	Sigma
Tris (Art.-Nr. A1086)	AppliChem
Triton X-100 (Art.-Nr. X100)	Sigma
TWEEN® 20 (Art.-Nr. P-1379)	Sigma
Tetracyclin	ICN Biochemicals

2.11 Peptide, inhibitorische Substanzen und Toxine

FIP (Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH)	Bachem
Den01 (H2N-Met-Ala-Ile-Leu-Gly-Asp-Thr-Ala-OH)	Pharmazeutische Chemie, Würzburg
Den02 (H2N-Trp-Asp-Phe-Gly-Ser-Leu-Gly-Gly-Val-OH)	Pharmazeutische Chemie, Würzburg
Den03 (H2N-Phe-Thr-Ser-Ile-Gly-Lys-Ala-Leu-OH)	Pharmazeutische Chemie, Würzburg
Den04a (H2N-Gln-Val-Phe-Gly-Ala-Ile-Tyr-OH)	Pharmazeutische Chemie, Würzburg
DN59 (MAILGDTAWDFGSLGGVFTSIGKALHQVFGAIY)	Pharmazeutische Chemie, Würzburg

Folgende inhibitorische Substanzen wurden von Sabine Niedermeier und Max Tischer in der Pharmazeutischen Chemie der Universität Würzburg in Zusammenarbeit mit Prof. Dr. Ulrike Holzgrabe kreiert und synthetisiert:

QD7 - 2	C15H18FN3O2
QD2 - 2	C16H18N4O2
QD2 - 3	C16H19N3O4
QD2 - 1	C18H13N3O2
QD5 - 1	C18H13F3N2O2
QD6 - 1	C18H13F3N2O2
QD7 - 1	C17H13FN2O2
QED6 - 11	C19H13CIF4N2O2
QED6 - 6	C20H17F3N2O3
QED15A - 12	C26H25CI2FN4O3
JK8/2	C26H27N3O9
OX-1 (=Ref1; PNAS,2004 April 13; 101 (15))	C14H13CIN2O
TG46.2F	C7H15CIN2O
QED6 - 7	C17H17F3N2O2
QED6 - 9	C21H19F3N2O3
QED6 - 10	C19H16F3N3O2
QED5 - 13	C20H18F3N3O2
MM3C	C39H52N4O4Br2
MT05	C44H58N6O4Br2
JSW155	C17H17N3O4
QED7 - 10	C18H16FN3O2
JK41	C7H6CIN3
JK80	C11H14N4OS
QED15B - 12	C27H28CI2FN3O4
QED6 - 8	C20H16CIF3N2O2

TG102	C19H19N3O5
TG14	C19H21N3O3
QED16 - 9	C20H18CIFN2O3
QED6 - 10	C19H16F3N3O2
QED15A	C19H20FN3O4
JS06	C19H22N2O2
MT01	C19H21N3O4
MM7a	C22H29N4O4Br
JS08	C26H34N2O2Br2
MM4b	C44H56N4O4Br2
MM3f	C42H52N4O4Br2
MT04	C44H54N6O8Br2
MT06	C44H58N6O6Br2
MM3a	C38H50N4O4Br2
MM3I	C38H49N5O6Br2
MM3j	C38H51N5O4Br2
MM8afp	C38H44N4O4Cl2
MT02	C44H54N6O8Br2
MM6	C37H49N5O6Br2
GH02	C15H12NO
GH35	C15H13O3
GH43	C16H15O3
GH18	C15H13N3O4
GH36	C15H13N3O4

Zusätzlich wurden folgende Toxine und Inhibitoren verwendet:

Toxin B (Clostridium difficile)	Prof. Dr. Klaus Aktories, Universität Freiburg
Lethal Toxin LT (Clostridium difficile)	Prof. Dr. Klaus Aktories, Universität Freiburg
Rho-assoziiertes Proteinkinase Inhibitor (Y-27632)	Sigma
Rac1 Inhibitor	Calbiochem
Cytochalasin D	Calbiochem
Latrunculin B	Calbiochem
LY294002 (PI-3-Kinase Inhibitor)	Cell Signaling

2.12 Kits

DNA Labelling Kit	MBI Fermentas
EndoFree Plasmid MaxiKit	Qiagen
Nucleo Trap	Macherey-Nagel
QIAprep spin Miniprep Kit	Qiagen
QIAquick Gel Extraction Kit	Qiagen
QIAgen Plasmid Midi Kit	Qiagen
QIAgen Plasmid Maxi Kit	Qiagen
PuRe Taq Ready-To-Go TM PCR Beads	Healthcare
GenElute TM Mammalian Total RNA Purification Kit	Sigma
SuperSignal West Pico Substrate	Pierce
BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit	Applied Biosystems
SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate	Pierce
QuickChange [®] II Site-Directed Mutagenesis Kit	Stratagene
Silencer [®] siRNA Starter Kit	Ambion
ImmunoPure [®] Fab Preparation Kit	Pierce

2.13 Verbrauchsmaterial

Deckgläser	Superior Marienfeld
Dialyseschläuche Typ 27/32	Serva
Durchflusszytometrieröhrchen	Becton Dickinson
Einmalhandschuhe	Acid Bonz Proline
Einmalskalpelle	Zentrallager des Uniklinikums
Elektrophoreseapparatur	Inst. für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
Gelträger	Inst. für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
Glasarbeitsplatte	Inst. für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
Glasküvetten	Pharmacia
Kämme verschiedener Größe	Inst. für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
Lab-Tek II Chamber Slide TM	Nalge Nunc
Lab-Tek Chamber Slide TM Permanox slide sterile	Nalge Nunc
Kryokonservierungsröhrchen	greiner bio-one
Membranfilter 0,2 µm mit 47 mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
Membranfilter 0,45 µm mit 47 mm Durchmesser	Schleicher & Schuell
Nitrozellulosetransfermembran Protran 0,45 µm	Schleicher & Schuell

Pasteurpipetten	Nalge Nunc
Pipettenspitzen	Carl Roth, Eppendorf
Plastikartikel für Bakterien- und Zellkultur	Greiner, Nunc
Röntgenfilme	Kodak
Einmalküvetten UVette	Eppendorf
Venenverweilkatheter Vasculon Plus 16 G	Becton Dickinson
Whatman-Papier Typ GB002 (Art.-Nr. 013151)	Schleicher & Schuell
Zellkulturflaschen Cellstar TM mit Filter	greiner bio-one
Zellkulturflaschen Cellstar TM ohne Filter	greiner bio-one
Zellkulturplatten 6 Wells	greiner bio-one
Zellkulturplatten 12 Wells	greiner bio-one
Zellkulturplatten 24 Wells	greiner bio-one
Zellkulturplatten 48 Wells	greiner bio-one
Zellkulturplatten 96 Wells	Becton Dickinson
15-ml-Zentrifugenröhrchen	greiner bio-one
50-ml-Zentrifugenröhrchen	greiner bio-one

2.14 Geräte

Autoklav 23	MELAG Medizintechnik
Bakterienschüttler	Infors
Brutschränke	Heraeus
FACSanner	Becton-Dickinson
Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Konfokales Fluoreszenzmikroskop	Leitz
Laborwaage	Mettler
Mehrkanalpipette	Flow Laboratories
Mikropipetten	Eppendorf / Socorex / Gilson
Mikroskop (Durchlicht)	Leitz
Netzgeräte	BioRad
PCR-Maschine Thermal Cycler DNA 480	Perkin Elmer
Rotoren	Hettich, Sorvall, Beckmann
Spektrometer	Pharmacia
Sterilbank	Heraeus / Gelaire
Tischzentrifuge	Hettich, Eppendorf

Vortexer	Bender + Hobein
Wasserbad	Hartenstein
Zählkammer	Thoma
Analysewaage	Sartorius
BioPhotometer 6131	Eppendorf
Blottingapparatur	Inst. für Virologie und Immunbiologie, Würzburg
Digitalkamera DC 300F	Leica Microsystems
Fluoreszenzmikroskop Aristoplan	Leitz
Inversmikroskop Labovert FS	Leitz
Konfokales Mikroskop	Leitz
Kühlschrank 4 °C	Siemens
Magnetheizrührer Ikamag RCT	IKA Labortechnik
Mikropipetten	Eppendorf
Mikrowellengerät	Panasonic
Netzgerät	Gibco
pH-Meter	Mettler Toledo
Standzentrifuge J2-MC	Beckman Coulter
Standzentrifuge Rotixa KS	Hettich
Tischzentrifuge Millifuge	Millipore
Transilluminator	Vilber Lourmat
Ultraviolettlichteinheit	Vilber Lourmat
Wippschüttler	Edmund Bühler

3 Methoden

3.1 Zellbiologische Methoden

3.1.1 Zellkultur adhärenter und in Suspension wachsender Zellen

Alle adhärenenten Zelllinien wurden in Zellkulturflaschen mit Filter in NaHCO_3 -gepuffertem MEM, 5 % (v/v) FKS für HeLa- und Vero - Zellen, 10 % (v/v) für CHO-Zellen) und Antibiotika (Penicillin und Streptomycin mit einer Endkonzentration von etwa 240 $\mu\text{g}/\text{ml}$) in einem 37 °C-Brutschrank unter 5 % CO_2 -Begasung kultiviert. Nach Ausbildung eines fast vollständig konfluenten Zellrasens wurden diese mit 3 ml ATV-Lösung abgelöst und im Verhältnis von 1 : 5 bis 1 : 10 in neue Flaschen ausgesät und mit frischem Zellkulturmedium ersetzt.

Als Zellkulturmedien für die adhärenent wachsenden 293T-Zellen kam RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FKS zum Einsatz. Zur Verringerung des Kontaminationsrisikos der Kulturen mit Bakterien wurden dem Medium Antibiotika in der bereits erwähnten Menge zugegeben.

Die Kultur von Endothelzellen erfordert die Beschichtung der Böden der Kulturgefäße, um eine verbesserte Zelladhärenz zu gewähren (Beschichtung mit 0,5 %iger Gelatinelösung). Für die Kultur von HUVEC wird als Grundnährmedium Medium 199 mit Earle-Salzen, 2 mM L-Glutamin und 25 mM HEPES verwendet. Eine Anreicherung findet mit 20 % (v/v) FKS, 5 U/ml Heparin, 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ECGS und der schon genannten Antibiotikakombination statt.

Suspensionszellen hingegen wurden in ebenfalls mit Filtern ausgestatteten Zellkulturgefäßen aus Kunststoff in RPMI 1640 und zusätzlich 10 % (v/v) FCS und der schon beschriebenen Antibiotikakombination im befeuchteten Brutschrank bei 37 °C und unter Begasung mit CO_2 (5 %) inkubiert. Erreichen die Zellen in der Suspensionskultur eine Dichte, die eine weitere Zellvermehrung erschwert, werden die Zellen je nach Bedarf im Verhältnis von etwa 1 : 5 bis 1 : 10 wieder in neue Zellkulturgefäße überführt und mit entsprechendem Zellkulturmedium versetzt.

Im Fall von Hybridomzellen wurde ebenfalls RPMI 1640 mit zusätzlich 10 % (v/v) FKS oder ein spezielles Hybridommedium Hybri-Care (46-X) von ATCC verwendet, dem zusätzlich noch 10 % (v/v) FKS zugesetzt wurde.

Um die kultivierten Zellen vor den Komplementfaktoren und kreuzreagierenden Antikörpern zu schützen, wurde das FKS vor seiner Verwendung für 30 min bei 60 °C inaktiviert, um schließlich in den notwendigen Mengen eingesetzt werden zu können.

3.1.2 Einfrieren und Auftauen von Zellen

Zellen können in flüssigem Stickstoff über längere Zeit aufbewahrt werden. Hierzu wurden $3 - 5 \times 10^6$ adhärenente Zellen oder 1×10^7 Suspensionszellen abzentrifugiert (10 min, 4 °C, 1.200 rpm) und das Pellet anschließend in kaltes Einfriermedium (FKS, 10 % (v/v) DMSO) überführt. Anschließend wurde die resuspendierte Zellsuspension in vorgekühlte Kryo-Röhrchen überführt. Das Einfrieren erfolgte in einer mit Isopropanol gefüllten Einfrierbox bei -80 °C, um eine langsame Abkühlung der Zellsuspension von ca. 1 °C pro Minute zu erreichen. Anschließend folgte eine Überführung in flüssigen Stickstoff, wo die Zellen dann über längere Zeit gelagert werden konnten.

Zum Auftauen wurde die gefrorene Zellsuspension schnell in einem handwarmen Wasserbad aufgetaut und anschließend in ein mit kaltem Medium gefülltes 15 ml-Röhrchen überführt, um das in der Zellsuspension enthaltene toxische DMSO zu verdünnen. Anschließend wurden die Zellen pelletiert (10 min, 4 °C, 1.200 rpm), in frischem Zellkulturmedium aufgenommen und in 1 - 2 kleine Zellkulturflaschen (25 cm^2) überführt. Nach erfolgter Anheftung der Zellen an die Kulturflaschenoberfläche wurde das Medium nach 24 h nochmals erneuert, um bereits tote Zellen zu entfernen.

3.1.3 Gewinnung von Endothelzellen aus der menschlichen Nabelschnurvene

3.1.3.1 Ansetzen der Collagenaselösung

500 mg lyophilisierte Collagenase A, ein aus *Clostridium histolyticum* isoliertes, ungereinigtes Gemisch aus Clostridiopeptidase A, Proteasen, Polysaccharidasen und Lipasen, wurden in 1.000 ml sterilem PBS gelöst. Anschließend wurde diese Lösung zur Minderung des Kontaminationsrisikos steril filtriert. Die gefilterte Collagenase-A-Lösung wurde im Anschluss in Portionen von etwa 40 ml in sterile 50 ml-Falconröhrchen überführt und rasch eingefroren. Dort konnte die Lösung bis zu drei Monaten bei -20 °C aufbewahrt werden. Vor der anstehenden Isolierung von Endothelzellen aus der Nabelschnurvene wurde die Lösung dann im Wasserbad bei 37 °C aufgetaut und mit einer Temperatur von 37 °C bei maximaler Enzymaktivität verwendet.

3.1.3.2 Herstellung der Beschichtungslösung für die Kultur humaner Endothelzellen

5,0 g Gelatine vom Typ A aus Schweinehaut wurde in 1.000 ml destilliertem Wasser auf eine Temperatur zwischen 80 – 100 °C erhitzt und bis zur vollständigen Auflösung der Gelatine unter stetem Rühren mit einem Rührfisch auf einem beheizbaren Magnetrührgerät inkubiert. Die erhaltene 0,5 % (w/v) Gelatinelösung wurde anschließend bei ca. 120 - 130 °C in einem Autoklaven sterilisiert und aliquotiert bei Verwendung innerhalb von zwei Wochen bei 4 °C im Kühlschrank, bei Lagerung von bis zu drei Monaten bei -20 °C im Gefrierschrank aufbewahrt.

3.1.3.3 Beschichtung von Kunststoff- und Glasmaterialien für die Kultur humaner Endothelzellen

Für die Kultur von HUVEC mussten die Zellkulturgefäße mit Gelatinelösung beschichtet werden. Hierzu wurden die Böden von Zellkulturgefäßen aus Kunststoff zunächst mit 0,5 % (w/v) Gelatinelösung bei Raumtemperatur für 30 min inkubiert und anschließend von überschüssiger Gelatinelösung befreit. Nun wurde einmalig mit sterilem PBS gewaschen, indem der Boden des Zellkulturgefäßes für 10 min mit sterilem PBS inkubiert wurde. Die Waschlösung konnte dann mit Hilfe steriler Glaspipetten abgenommen werden und die Zellkulturgefäße bei 4 °C in Cellophan gewickelt zwischengelagert werden.

Böden von Zellkulturgefäßen aus Glasmaterialien wurden zunächst ebenfalls mit 0,5 % (w/v) Gelatinelösung behandelt und nach deren Entfernung wurden drei Waschschrte von jeweils 10 min mit sterilem PBS durchgeführt. Nach Abnahme der PBS-Lösung wurden die Gefäße in Cellophan eingewickelt und anschließend bei 4 °C gelagert.

3.1.3.4 Isolierung der Endothelzellen

Endothelzellen der menschlichen Nabelschnurvene, sogenannte human umbilical vein endothelial cells (HUVEC), können durch Enzymbehandlung aus der Nabelschnurvene gewonnen und anschließend kultiviert werden. Die Isolationsmethode basiert hauptsächlich auf dem Protokoll von Jaffe et al. 1973, das 2001 noch einmal anschaulich von Marin et al. zusammengefasst wurde.

Hierzu wurde die Nabelschnur (Ns) mit einem scharfen Skalpell nahe der Abklemmungsstelle und nahe der Plazenta durchtrennt. Um Austrocknung und Kontaminationen zu verhindern wurde die Ns in einem Glasgefäß mit Schraubverschluss, das mit etwa 80 ml steriler PBS-Lösung und einem Röhrchen Antibiotikumkombination gefüllt wurde, im Kühlschrank bei 4 °C bis zur Weiterverarbeitung gelagert. Bei der Weiterverarbeitung wurde die menschliche Ns aus dem Glas entnommen, kurz in 70 % (v/v) technisches Ethanol eingetaucht und in sterilem PBS eingelegt. An beiden Enden der Ns wurde diese auf einer sterilen Glasarbeitsplatte mit einem Skalpell um etwa 1 cm gekürzt, um die abgebundenen, gequetschten Stellen, die durch die Klemmen

verursacht wurden, restlos zu entfernen. Aus einem 16 G dicken Venenverweilkatheter wurde die Kanüle entfernt und nur der verbliebene Katheter vorsichtig in die Nabelschnurvene eingeschoben. Vorher sollte unbedingt noch einmal genau die Nabelschnurvene von den beiden Nabelschnurarterien abgegrenzt werden. Nun konnte die Vene mit mindestens 40 ml sterilem PBS gespült werden, bis makroskopisch kein venöses Blut mehr sichtbar war. Mit auf 37 °C erwärmter 0,05 % (w/v) Kollagenase-A-Lösung wurde das überschüssige PBS ausgespült und die Nabelschnur an dem Katheter entgegengesetzten unteren Ende mit einer Metallklemme abgeklemmt. Im Anschluss wurde die Nabelschnurvene mit der Kollagenase-A-Lösung prall gefüllt und knapp am oberen Rand abgeklemmt. Erst dann konnte der Venenverweilkatheter vorsichtig gezogen werden und die Ns in einem mit sterilem PBS gefüllten Wasserbad bei 37 °C für 7 min inkubiert werden. Abbildung 3.1.3.4.1 zeigt die anatomischen Verhältnisse der Nabelschnur.

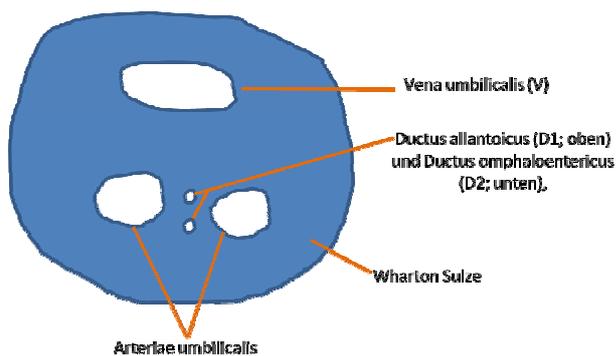


Abbildung 3.1.3.4.1: Schematischer Querschnitt durch die menschliche Nabelschnur. Querschnitt der menschlichen Nabelschnur mit der V.umbilicalis (V), den beiden Aa. umbilicales (A) und den Resten von Ductus allantoicus (D1) und Ductus omphaloentericus (D2), die in die gallertartige Substanz der Wharton-Sulze eingebettet sind (Vorlage aus Geburtshilfe und Frauenheilkunde, von C. Geist und H. Hofmann, de Gruyter-Verlag; ISBN 311015532 X).

Nach der Inkubationszeit wurde die Nabelschnur für ca. 2 min leicht massiert, um die Endothelzellverbände besser lösen zu können. Anschließend wurde im Abstand von 1,5 cm der unteren Metallklemme eine weitere angebracht und die Nabelschnur mit einem Skalpell zwischen diesen beiden Metallklemmen durchtrennt. Die zuletzt angebrachte Klemme wurde nun entfernt und der Inhalt der Nabelschnurvene in ein Zentrifugationsröhrchen mit Medium 199 und 10 % (v/v) FKS einlaufen gelassen. Die Nabelschnurvene wurde nicht ausgedrückt oder mit sterilem PBS nachgespült, da sonst andere, nicht erwünschte Zellverbände mit in die Zellsuspension gelangen könnten. Im Anschluss wurden die Endothelzellen bei 4 °C und 1.000 rpm für 10 min pelletiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde schließlich je nach geschätzter Zellausbeute in etwa 5 ml HUVEC-Medium 199 mit Antibiotika und 10 % (v/v) FKS aufgenommen und in beschichtete Zellkulturgefäße ausgesät. Nach 24 h wurde das Medium durch frisches ersetzt, um die bereits abgestorbenen oder nicht angesetzten Endothelzellen bzw. die nicht erwünschten Zellen, wie Erythrozyten, die durch enzymatische Auflösung von kleinen geronnenen Blutklümpchen in die Kultur gelangt sind, zu entfernen. Die HUVEC befinden sich nun in der 0. Passage und können bis kurz vor Erreichen eines Monolayers vermehrt werden.

3.1.4 Zellzählung

Zellen wurden vor ihrer Verwendung für verschiedene Experimente gezählt. Hierfür wurde ein Hämozytometer in Form einer Zählkammer mit einer Einteilung nach Thoma benutzt. Dazu wurden die zu zählenden Zellen mit ATV gelöst und mit Zellkulturmedium in eine homogene Suspension versetzt. Die Zelldichte ergibt sich nun aus der Multiplikation der ausgezählten Zellen der 4 x 4 Gruppenquadrate von 0,2 mm Kantenlänge mit dem Faktor 1×10^4 und beschreibt die Zellzahl je ml.

3.1.5 Kultur von Hybridomzellen zur Antikörpergewinnung

Hybridomzellen, die durch die Fusion von Antikörper produzierenden B-Zellen mit den immortalisierten, murinen Myelomzellen entstanden sind, wurden in RPMI 1640 mit 10 % (v/v) FCS oder in Hybri-Caremedium (46-X) mit 10 % FCS als leicht adhärenzte Zellen im befeuchteten Brutschrank bei 37 °C und unter Begasung mit 5 % CO₂ inkubiert. Bei Erreichen eines relativ konfluenten Zellrasens wurde das überstehende Nährmedium mit den in Suspension gegangenen Hybridomzellen regelmäßig gegen frisches ausgetauscht. Das entfernte Nährmedium wurde anschließend als Ausgangslösung zur Aufreinigung und Konzentrierung des monoklonalen Antikörpers verwendet. Zur Teilung der Zellkultur wurde der Boden der Zellkulturflasche mit frischem Nährmedium gespült und die erhaltene Zellsuspension auf neue Zellkulturflaschen ausgesät. Die Erfahrung zeigt, dass sich für die Zucht von Hybridomzellen kleine Zellkulturflaschen (25 cm²) am besten eignen.

3.1.6 MTT-Vitalitätstest

Bei diesem Test kann man sich die Tatsache zu Nutze machen, dass das Tetrazolium-Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromid (MTT) von lebenden Zellen aufgenommen und von mitochondrialen Dehydrogenasen in ein violettes Formazan-Produkt umgewandelt wird. Dieses Produkt kann nicht durch zelluläre Membranen diffundieren und ist weitgehend unlöslich. Es fällt daher in vitalen Zellen aus und bildet Kristalle, die im Mikroskop sichtbar sind. Mit organischen Lösungsmitteln lassen sich die Formazankristalle solubilisieren und mit einem colimetrischen Test vermessen. Nur lebendige Zellen mit einem aktiven Stoffwechsel sowie Zellen, die sich in der Frühphase der Apoptose befinden, setzen MTT um. Zellen in der späten Phase der Apoptose und tote Zellen tun dies nicht. Daher ist die gemessene Menge an Formazan ein Maß für die Anzahl und Vitalität der Zellen.

Die zu untersuchenden Vero-Zellen, die in einer Menge von $2,5 \times 10^5$ pro well ÜN zur Adhärenz gebracht und in der darauffolgenden Nacht mit den zu testenden Inhibitoren in verschiedenen Konzentrationen inkubiert wurden, wurden für 2 h bei 37 °C mit je 1 ml 5 %igem MEM pro well einer 6-well-Platte versorgt. Im Anschluss wurde das Medium restlos entfernt und durch 750 µl MTT-Lösung pro well ersetzt, welche ebenfalls 2 h auf den Zellen bei 37 °C einwirken sollte. Der bereits nach kurzer Zeit sichtbare Farbumschlag von gelb nach lila zeigt die Umsetzung des Tetrazolium-Salzes zu Formazankristallen. Um diese anschließend aus den Zellen lösen zu können, wurden zu den von der überschüssigen MTT-Lösung komplett befreiten Zellen 750 µl Extraktionslösung gegeben und 45 min bei RT inkubiert. Der gefärbte Überstand eines wells einer 6-well-Platte wurde dann in 50 µl Aliquots auf 12 wells einer 96-well-Platte verteilt, um im Anschluss bei einer Wellenlänge von 570 nm (Referenzwellenlänge 620 nm) im ELISA-Reader gemessen zu werden. Als Positivkontrolle wurden ausschließlich mit PEI behandelte Vero-Zellen verwendet, wobei die Negativkontrolle ausschließlich aus PEI-behandelten Vero-Zellen, die zusätzlich mit 100 % DMSO (Lösungsmittel der Inhibitoren) behandelt wurden, bestand. Die 12 Ergebnisse pro well wurden gemittelt und in die prozentuelle Vitalität im Vergleich zu unbehandelten Zellen umgerechnet.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Infektion von adhärennten Zellen

Dazu wurden $2,5 \times 10^5$ pro well adhärennte Zellen in 6-well-Platten ausgesät, so dass sie am nächsten Tag zwischen 70 - 80 % konfluent waren. Die Zellen wurden dann mit verschiedenen Virus-Stämmen mit der gewünschten MOI in serumfreiem Medium bei 37 °C inkubiert sowie ab und zu hin und her bewegt. Nach 2 h wurde der Überstand von den Zellen abgezogen und die Zellen mit frischem Medium bei 37 °C im Brutschrank kultiviert. Nach 24 h bzw. 48 h wurde der Zellrasen auf Synzytium untersucht.

3.2.2 Infektions-Inhibitions-Versuche mit Antikörpern und inhibitorischen Substanzen

Vero-Zellen wurden mit $2,5 \times 10^5$ Zellen pro well einer 6-well-Platte ausgesät (oder 8×10^4 Zellen pro chamber eines 4-well chamberslides) und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 70 - 80 % erreicht hatten, erfolgte die Infektion durch einstündige Inkubation mit MOIs von 0,1 - 1 in serumfreiem Medium. Zur Untersuchung der Wirkung von Antikörpern oder inhibitorischen Substanzen wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während oder nach der Infektion mit mAK K41 inkubiert. Dazu wurden 15 µg/ml mAK K41 oder zwischen 0,5 - 20 µM inhibitorische Substanzen zu den Zellen gegeben und die Fusionsinhibition nach 24 h bzw. 48 h dokumentiert.

3.2.3 Transfektions-Inhibitions-Versuche mit Antikörpern und inhibitorischen Substanzen

Vero-Zellen wurden mit $2,5 \times 10^5$ Zellen pro well einer 6-well-Platte ausgesät (oder 8×10^4 Zellen pro chamber eines 4-well chamberslides) und ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Nachdem die Zellen eine Konfluenz von ca. 70 - 80 % erreicht hatten, erfolgte die Transfektion in 1 ml serumfreiem Medium. Zur Untersuchung der Wirkung von Antikörpern oder inhibitorischen Substanzen wurden die Zellen zu verschiedenen Zeitpunkten vor, während oder nach der Transfektion mit mAK K41 oder inhibitorischen Substanzen inkubiert. Dazu wurden 15 µg/ml mAK K41 oder zwischen 0,5 - 20 µM inhibitorische Substanzen zu den Zellen gegeben und die Fusionsinhibition nach 18 - 20 h dokumentiert.

3.2.4 Transfektions-Assays

$2,5 \times 10^5$ Vero- oder 4×10^5 CHO-Zellen wurden zu 80 % Konfluenz in 6-well-Platten ausgesät und ÜN zur Adhäsion gebracht. Am nächsten Tag wurde das Medium 1 h vor der Transfektion gegen serumfreies Medium ersetzt. Währenddessen wurden 2 µg der DNA-Plasmide (pCG-F und pCG-H von CDV, MV und NIV) auf 50 µl serumfreies Medium aufgefüllt und in einem Eppendorf-cap vermischt. Außerdem wurden 1,5 µl PEI (Polyethylenimine) und 48,5 µl serumfreies Medium in einem Transfektionsröhrchen vermischt, zu dem Plasmid-Mediumansatz gegeben und gemixt. Nach einer Inkubation von 30 min bei RT wurden die Zellen vom serumfreien Medium befreit und dann mit je 100 µl des PEI-Plasmid-Mixes versehen sowie auf 1 ml mit vorgewärmtem serumfreiem Medium versetzt. Nach 18 - 20 h wurde die Größe der sich gebildeten Synzytien durch Auszählen der enthaltenen Nuklei dokumentiert.

Im Fall von siRNA-Transfektionen wurden 5×10^4 HeLa-Zellen auf 4-well chamberslides ausgesät. Am nächsten Tag wurden je 1 µl siPort NeoFix Transfektionsreagenz pro well verwendet und die Transfektion nach 48 h ein weiteres Mal wiederholt. Der Transfektionsmix bestand aus 49 µl serumfreiem Medium und 1 µl siPORT NeoFX Reagenz, die 10 min bei RT inkubiert wurden, und 30 - 100 pmol der siRNA in 50 µl serumfreiem Medium, die gemeinsam vermischt bereits 10 min bei RT inkubiert wurden. Nachdem das Medium von den Zellen entfernt

worden war, wurde der Transfektionsmix auf den Zellen verteilt und mit 900 µl serumfreiem Medium aufgefüllt. Nach 48 h wurde die Transfektion ein weiteres Mal wiederholt und die Zellen nach 96 h analysiert.

3.2.5 Vermehrung von Dengue-Virus-Serotypen

Da das Dengue-Virus zu den hämorrhagischen Fiebern gezählt wird, wird es laut dem RKI in die Risikogruppe 3 eingestuft. Zur Amplifikation der verschiedenen Dengue-Virus-Serotypen 1 - 4 wurden Vero-Zellen in 75-cm²-Zellkulturflaschen bis zur Ausbildung eines Monolayers mit einer Dichte von etwa 70 % in 5 %igem Ciprobay-MEM Medium kultiviert. Nachdem das Nährmedium durch 10 ml serumfreies Nährmedium ersetzt wurde, wurde die Zellkultur anschließend mit den Serotypen 1 - 4 mit einer MOI = 1 inokuliert. Bei 37 °C im Brutschrank inkubierten die unterschiedlichen Infektionsansätze für Serotyp 1 und 2 für 4 - 5 Tage, während für Serotyp 3 und 4 ca. 5 - 7 Tage angesetzt wurden. Waren die Zellen nach dieser Zeit komplett durchinfiziert, was am für Dengue-Viren typischen CPE zu erkennen war, wurden sie vom Flaschenboden abgekratzt und zusammen mit dem Medium abgezogen. Anschließend wurde durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren auch das zellgebundene Virus (im Falle von Dengue Viren nur eine recht geringe Menge) freigesetzt und das gesamte Gemisch für 15 min bei 4.000 rpm 4 °C abzentrifugiert. Der Überstand wurde in Kryo-Röhrchen aliquotiert und bei -80 °C verwahrt.

3.2.6 Virusvermehrung verschiedener Paramyxoviren

Zur Amplifikation des attenuierten MV-Edm und CDV-OND-LP wurden Vero-Zellen in 175 cm²-Zellkulturflaschen bis zur Ausbildung eines Monolayers mit einer Dichte von etwa 80 % kultiviert und nach Entfernen des Nährmediums mit etwa 5 ml serumfreiem Nährmedium versetzt. Zur Vermehrung des MV-Stammes IC323 wurde anstatt der Vero-Zellen die stabil transfizierte Vero-SLAM-Zelllinie verwendet.

Anschließend wurde die Kultur mit den Virusstämmen mit einer MOI von 0,01 inokuliert und für 60 min bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Danach wurde das Nährmedium abgezogen und durch 15 ml des serumhaltigen Nährmediums ersetzt. Die Zellkultur wurde nun bis zum Erreichen des maximalen zytopathischen Effekts, d.h. bis zur Ausbildung eines Monolayers mit vielen, riesigen Synzytium, noch vor der Lyse der infizierten Zellen über einen Zeitraum von etwa 2 - 4 Tagen im Brutschrank bei 3 °C inkubiert. Dann wurde das Medium abgezogen und durch 2 - 4 ml serumfreiem Nährmedium ersetzt, so dass der Zellrasen gerade noch benetzt war, und die Zellkulturflasche ÜN bei -80 °C eingefroren. Am nächsten Tag wurde die Zellkulturflasche auf Eis langsam zum Auftauen gebracht und das zellgebundene Masern-Virus (MV) oder Hundestaube-Virus (CDV) mit Hilfe eines Zellschabers und durch vorsichtiges Auf- und Abpipettieren freigesetzt. Die Zellsuspension wurde anschließend noch in einem Douncer mechanisch auf und ab bewegt, um die Ausbeute an Viruspartikeln zusätzlich zu erhöhen.

Nun wurde das Zelldebris für 15 min bei 4.000 rpm, 4 °C abzentrifugiert und der Überstand in Kryo-Röhrchen aliquotiert. Die Lagerung findet für einen längeren Zeitraum bei -80 °C statt. Gleichzeitig zu dieser Viruspräparation wurden Vero-Zellen und Vero-SLAM-Zellen bis auf den Schritt der Infektion exakt gleich behandelt. Dadurch wurde ein Überstand geerntet, der als negative Kontrolle für Infektionsversuche genutzt werden kann und als Mockpräparation bezeichnet wird.

3.2.7 Virustiterbestimmung mittels Plaquetitration

Der Plaquetest erlaubt eine recht genaue Berechnung des Titters infektiöser Viruspartikel, indem man sich die Ausbildung von sogenannten Plaques (Infektionsherde), die in einem Zellmonolayer entstehen, zu Nutze macht. Dabei eignen sich die sehr gut adhärierenden Vero-Zellen wegen ihrer Rezeptorausstattung nur für die Titerbestimmung vom Masern-Virus- (MV-Edm) und Hundestaubeimpfstämmen (CDV-OND-LP), weshalb für die Titration von MV IC323 Vero-SLAM-Zellen verwendet wurden.

Zur Durchführung des Tests wurden $1,5 \times 10^5$ Vero-Zellen oder Vero-SLAM-Zellen in eine 6-well-Platte ausgesät und ÜN im Brutschrank bei 37 °C inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} - 10^{-8} von den zu untersuchenden Viruslösungen auf Eis angesetzt. Je Verdünnungsstufe wurde 1 ml auf einen ca. 70 - 80 %igen Zellmonolayer der 6-well-Platte überführt, von dem zuvor das Nährmedium vollständig abgezogen worden war. Nach einer Inkubationszeit von 60 min bei 37 °C wurde das virushaltige Nährmedium abpipettiert, der Zellmonolayer zweimal mit serumfreiem Nährmedium gewaschen und vorsichtig mit 40 °C temperiertem Overlay-Agar überschichtet. Nachdem der Overlay-Agar bei RT fest geworden war, wurden die infizierten Zellen für 5 Tage bei 37 °C bis zur Ausbildung deutlicher Infektionsherde, die durch den zytopathischen Effekt der Synzytiumbildung des Virus im Monolayer entstehen, inkubiert. Im Anschluss folgte die Färbung der Overlayschicht mit 1 ml pro well 1 : 100 in PBS verdünnter Neutralrotlösung für 1 h bei RT. Hiernach wurde die überschüssige Neutralrotlösung abgezogen, auf Papiertüchern abgeklopft und die Verdünnungsstufe gibt die Menge der infektiösen Partikel in 1 ml der Viruslösung wieder. Zellkulturplatten im Brutschrank bei 37 °C für weitere 24 h inkubiert. Abschließend wurden die Ansätze hinsichtlich der Ausbildung von Plaques beurteilt, die sich als ungefärbte Areale gegenüber der gefärbten Umgebung zeigten. Es wurde die Verdünnungsstufe zur Auszählung der Plaques verwendet, in der deutlich die letzten gebildeten Plaques zu erkennen waren. Die Anzahl der Plaques multipliziert mit dem reziproken Wert der

3.2.8 Virustiterbestimmung mittels TCID₅₀ Test (50 % - Endpunkt-Titration)

Die Konzentration infektiöser Partikel in Präparationen der Dengue-Virus Serotypen 1 - 4 wurde anfänglich mittels Endpunkttitration versucht zu bestimmen. Dazu wurden 9×10^3 Vero-Zellen zur Titerbestimmung in 96-well-Platten mit jeweils 400 µl Nährmedium mit 5 % FCS MEM ausplattiert und ÜN im Brutschrank bei 37 °C zur Adhäsion gebracht. Am darauffolgenden Tag wurde eine Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-10} in serumfreiem MEM durchgeführt, indem 900 µl Medium vorgelegt und jeweils 100 µl der Viruslösung überführt wurden. Pro Verdünnungsstufe wurden acht Näpfe der Zellkulturplatte mit je 100 µl versetzt. Die infizierten Zellen wurden 7 Tage bei 37 °C inkubiert. Die Anzahl der CPE-positiven Näpfe sollte mit Hilfe einer Kristallviolett färbung bestimmt werden. Die TCID₅₀/ml und der Standardfehler wurden entsprechend den Formeln nach Spearman und Kärber berechnet.

$$\log TCID_{50} = x_{p=1} + 12d - dp \sum$$

Abbildung 3.2.8.1: Formel zur Berechnung der 50%igen Endpunkt-Titration nach Spearman und Kärber. In der Formel steht $x_p = 1$ für den dekadischen Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch ein CPE in allen Näpfen der Verdünnung zu finden ist. d steht für den dekadischen Logarithmus des Verdünnungsfaktors. p entspricht dem Anteil an CPE-positiven Näpfen pro Verdünnungsstufe. Summe p ist die Summe aller p ab der Verdünnungsstufe $x_p = 1$ und den p -Werten aller höheren Verdünnungen mit vorhandenem CPE. Es wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe berechnet, bei der 50 % der Zellen oder Näpfe einen CPE aufweisen.

3.2.9 Virustitration von Dengue-Virus mittels Immunfluoreszenz

Vero-Zellen wurden mit einer Dichte von 1×10^5 in 12-well-Platten ausgesät und nach Adhärenz der Zellen am darauffolgenden Tag im BSL-3-Labor infiziert. Zur Infektion wurden Dengue-Virus Serotyp 1 - 4 verwendet, die in einer Verdünnungsreihe von 10^{-1} bis 10^{-10} in serumfreiem MEM auf den Zellrasen gegeben wurden. Dazu wurden 1.800 µl Medium vorgelegt und jeweils 200 µl der Viruslösung überführt. Pro Verdünnungsstufe wurde je 1 ml auf den Zellrasen gegeben und die infizierten Zellen 7 Tage im Brutschrank bei 37 °C und 5 %iger CO₂-Begasung inkubiert, um dann mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung die vielen Infektionsherde (Foci) der Dengue-Infektion sichtbar zu machen. Dazu wurden die infizierten Zellen zuerst bei RT mit 4 %iger Paraformaldehydlösung (v/v) für 20 min fixiert und anschließend mit 0,1 %iger TritonX100-Lösung (v/v) für 10 min bei 4 °C permeabilisiert. Danach folgten drei Waschschrte mit PBS und die Zugabe des Erstantikörpers Maus α-Denguecomplex, pan der Firma US Biological 1 : 400 in 1 %igem BSA (v/v) für 1 h bei RT. Anschließend

wurde wiederum mit 1%igem BSA (v/v) drei Mal gewaschen und es folgte eine Inkubation mit dem Zweitantikörper α -Maus-IgG (H+L)-Alexa 488 in einer Verdünnung von 1 : 250 1 h bei RT. Zum Schluss wurden die Zellen drei Mal mit PBS gewaschen und bis zur Analyse am Mikroskop in 200 μ l PBS im Kühlschrank bei 4 °C aufbewahrt.

3.2.10 Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel

Retroviren sind neben Adenoviren die am häufigsten als Gentransfersystem eingesetzten Viren. Grundlage der meisten retroviralen Systeme ist das Moloney-Murine-Leukemia-Virus (MoMuLV), das bei neugeborenen Mäusen innerhalb von drei Monaten nach Infektion zur Entwicklung eines T-Zell-Lymphoms führt (Shinnick et al., 1981). Es besitzt die Strukturgene gag, pol und env für die viralen Proteine als auch cis-aktive Elemente, die für die Replikation nötig sind. Diese bestehen aus den Long-Terminal-Repeats (LTRs) mit den Regionen U3, R und U5, welche für die Transkription des viralen Genoms und die Integration der DNA-Form des Retrovirus (Provirus) in das Genom der infizierten Zelle notwendig sind. Außerdem sind weitere Elemente wie die Signale für die reverse Transkription des viralen Genoms und das Signal für die Verpackung des retroviralen Genoms in die viralen Partikel vorhanden. Dabei kodiert bei den Strukturgenen gag für die Matrix-, Capsid- und Nukleocapsidproteine, pol für die reverse Transkriptase, Integrase und Protease und env für die viralen Transmembranglykoproteine.

Der Grund für die Verwendung von Retroviren liegt darin, dass sie in das Wirtszellgenom integrieren und daher die genetische Information auch an Tochterzellen weitergegeben werden kann. Ihr Replikationszyklus weist zwei Besonderheiten auf:

- Nach Freisetzung des Capsid ins Zytoplasma wird das virale RNA Genom in DNA umgeschrieben, also revers transkribiert.
- Die nach der reversen Transkription vorliegende doppelsträngige provirale DNA integriert mit Hilfe der Integrase stabil in das Genom der Wirtszelle.

Bei Retroviren sind mehr Anpassungs- und Modifikationsmöglichkeiten vorhanden als bei anderen viralen Gentransfer-Systemen (Miller et al., 1993). So sind die retroviralen Strukturgene und das Genom unabhängig voneinander, denn als retrovirales Genom kann jede Sequenz dienen, die die Steuerelemente für die Verpackung, Expression und Integration in der richtigen Anordnung enthält. Die Anwesenheit retroviraler Strukturgene ist ebenfalls nicht notwendig und kann daher beliebig durch andere gewünschte Gene ausgetauscht werden, wobei lediglich eine Größengrenze von ca. 8 kb einzuhalten ist. Somit können die Glykoproteine auf der viralen Hüllmembran eines Retrovirus durch Glykoproteine eines anderen Virus ausgetauscht werden. Diese Methode wird als sogenannte Pseudotypisierung bezeichnet. Erste Experimente hierzu wurden mit zwei verschiedenen Viren, einem Retrovirus und dem Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV) durchgeführt. Nach der Doppelinfection erhielt man Virionen, die das Genom des einen Virus trugen, umhüllt von den Hüllproteinen des anderen Virus (Emi et al., 1991). Der Einbau fremder Proteine in die Hülle eines Virus ist also ein natürlich vorkommendes Phänomen, das bei gleichzeitiger Infektion einer Zelle mit zwei unterschiedlichen Viren mit Hüllmembran auftreten kann (Zavadá, 1982). Dieser Prozess konnte recht bald als labortechnische Methode zur Pseudotypisierung von Retroviren etabliert werden. Dabei können sowohl Pseudotypartikel, die das eigene und das fremde Hüllprotein in ihrer Hülle tragen, als auch solche, die ausschließlich das fremde Hüllprotein besitzen, entstehen. In retroviralen Systemen die auf MoMuLV basieren, wird zum einen auf Hüllproteine anderer Retroviren (das Hüllprotein des Gibbon-Ape-Leukemia-Virus, Miller, 1996), aber auch auf Hüllproteine nicht-verwandter Viren zurückgegriffen, wie z. B. das G-Protein des nicht pathogenen Vesikulären-Stomatitis-Virus (VSV) (Brun et al., 2008). Den genannten Hüllproteinen ist gemeinsam, dass die zugehörigen Rezeptoren u. a. auch bei humanen Zellen vorkommen und somit eine retroviral vermittelte Transduktion dieser Zellen möglich wird. Von Transduktion, und nicht von Infektion, spricht man, da in diesem System zwar vollständig infektiöse Viruspartikel entstehen können, diese aber aufgrund der nicht mehr originalen retroviralen Strukturgene nur noch das Genom stabil auf die Zellen übertragen können, ohne eine Virusvermehrung in den Zielzellen zu etablieren.

Gentechnisch veränderte, modifizierte Retroviren, sogenannte retrovirale Vektoren (Karavanas et al., 1998), eignen sich nicht nur hervorragend in der klinischen Genterapie, um einen therapeutischen Gentransfer durchzuführen, sondern auch im labortechnischen Bereich, um stabil transfizierte Zelllinien herzustellen, die dadurch neue genetische Eigenschaften bekommen und Gene, die von Interesse sind, exprimieren. Dabei wurden Gene für die gag-, pol- und env-Proteine entfernt und durch die gewünschten, zu transferierenden Gene ersetzt (Vile et al., 1995). Auf diese Weise können bestimmte Gene verschiedener Viren untersucht werden, ohne das Virus selbst verwenden zu müssen. Dies ist besonders bei Virusstämmen interessant, die normalerweise Untersuchungen in Sicherheitslaboren der Stufen III - IV erfordern. Eine gewisse genetische Grundinformation muss allerdings als Basis für die Integration des entsprechenden Gens in das Wirtszellgenom vorhanden sein: sie besteht aus dem Signal für die reverse Transkription und dem LTR Motiv zur Integration. Das RNA Verpackungssignal ist wichtig, damit die RNA ins Virion verpackt wird bzw. mit den Capsiden wechselwirkt. Die zusammengebauten Virionen können nun dafür verwendet werden, um entsprechende Zielzellen zu infizieren und so das gewünschte Gen einzubringen, welches im Anschluss von den infizierten Zellen eingebaut und transkribiert wird. Zur Erforschung der retroviralen Vektoren oder verschiedener Oberflächenproteine empfiehlt es sich lediglich ein GFP-Gen als Genom in die Vektoren einzubauen, um einen Infektionserfolg in den lebenden Zellen optisch bestimmen zu können. Die Detektion mit Hilfe des GFP-Gens ist sehr sensitiv und kann zum Beispiel dafür genutzt werden, um infizierte Zellen mit einem Zellsortierer von uninfizierten Zellen zu trennen.

Das MoMuLV-System hat allerdings den Nachteil, dass die Ausbeute retroviraler Partikel in adäquaten Verpackungszelllinien eher gering ist. Um dieses Problem zu lösen, wurde ein transientes Expressionssystem mit drei Plasmiden entwickelt, die gleichzeitig in die Zellen transfiziert werden (Soneoka et al., 1995). Dabei wurden Vektoren verwendet, die die Partikel markieren (pczCFG-fEYFP), die Gene für gag und pol (pHit 60) sowie für das VSV-G-Protein (pVSV-G) mit einem Promotor des Cytomegalovirus (CMV) sowie einen Replikationsursprung des Simian-Virus 40 (SV40) enthalten. Diese beiden Eigenschaften erhöhen deutlich die retrovirale Genexpression, sofern die Plasmide in Zellen eingebracht werden, die das große T-Antigen des SV40 tragen, wie dies bei 293T-Zellen (humane Nierenzelllinie) der Fall ist. Ein weiterer Vorteil dieses Drei-Plasmid-Systems ist die Möglichkeit, dass auch hier das Hüllprotein G von VSVG gegen andere Oberflächenhüllproteine unterschiedlichster Viren beliebig ausgetauscht werden kann. Durch derartige Kombinationen können auf diese Weise neue pseudotypisierte Retroviren entwickelt werden, die die zu untersuchenden Proteine bzw. „genes of interest“ enthalten.

Für die Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel wurden neben den für das System essentiellen Plasmiden (pHIT60 und pczCFG2-fEYFPf) noch pczVSV-G als Positiv-Kontrolle verwendet. Es konnten auch retrovirale Partikel unter Verwendung der Plasmide pCG-H5 und pCG-F1 (mit FIP), den Glykoproteinen des MV, hergestellt werden. Zu Beginn wurden 2×10^6 293T Zellen in 6 cm Schalen ausgesät und ÜN zur Adhärenz gebracht. Nun wurden 2 µg pHIT60, 2 µg pczCFG2-fEYFPf und 2 µg pczVSV-G auf ein Gesamtvolumen von 250 µl mit serumfreiem Medium MEM vermischt und zusätzlich pro 6 cm-Schale 18 µl PEI mit 232 µl serumfreiem Medium MEM angesetzt. Beide Lösungen wurden anschliessend miteinander vermischt und für 30 min bei RT inkubiert. Zuvor wurde die Zellkultur mit 4,0 ml 10 % FKS (v/v) MEM versorgt, um dann ca. 3 - 4 h Stunden später mit dem Transfektionsmix inkubiert zu werden. Nun wurden die 293T-Zellen bei 37 °C ÜN inkubiert und am nächsten Morgen mit 3 ml frischem, warmem MEM 10 % FKS (v/v) versorgt. Zur Expressionsverstärkung folgte anschließend die Zugabe von 60 µl 500 mM Natriumbutyrat. Nach 6 - 8 h wurde das Medium erneut gewechselt und nach einer weiteren Inkubationsperiode von 24 h der Überstand geerntet. Dieser konnte bei -80 °C weggefroren werden.

Mit verschiedenen Verdünnungen (10^{-1} - 10^{-8}) dieses Überstandes wurden im Anschluss 9×10^3 Vero-Zellen, die am Vortag in einer 48-well-Platte ausgesät worden waren, mit je 1 ml der Verdünnungsstufen transduziert und die Zahl der freigesetzten pseudotypisierten Partikel in Abhängigkeit von der Verdünnungsstufe nach 7 Tagen Inkubation unter dem Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.3 Histochemische Methoden

3.3.1 Immunfluoreszenzfärbungen für die Durchflußzytometrie

Bei den Immunfluoreszenzfärbungen für die Durchflußzytometrie wurden, falls nicht anders vermerkt, pro Ansatz 1 - 2 x 10⁵ Zellen verwendet. Die Färbungen wurden in 5 ml FACS-Röhrchen und alle Zentrifugations-schritte in einer vorgekühlten Hettich-Zentrifuge bei 1.200 rpm für 10 min durchgeführt.

Als FACS-Puffer (FP) für die Waschschrte bzw. zur Verdünnung der Antikörper wurde Ca/Mg-freies PBS, 0,4 % BSA, 0,02 % NaAzid, pH 7,4 verwendet. Primärantikörper und FITC-markierte Zweitantikörper wurden, falls nicht anders vermerkt, 1 : 100 verdünnt und in einem Volumen von 100 µl für 45 min bei 4 °C mit den Zellen inkubiert.

Bei den Lebendfärbungen gegen Oberflächenantigene wurden die Zellen ohne Fixierung mit dem entsprechenden Primärantikörper inkubiert und anschließend zweimal mit je 2 ml FP gewaschen. Nach Inkubation mit dem Zweitantikörper wurden die Zellen erneut zweimal gewaschen und anschließend für 10 min mit 3,7 % PFA (in Ca/Mg-freiem PBS) bei RT fixiert. Nach zwei abschliessenden Waschschrten wurden die Zellen in 500 µl FP resuspendiert und konnten nun in der Durchflußzytometrie analysiert werden.

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

3.3.2 Immunfluoreszenzfärbungen für die Mikroskopie

Für die Immunfluoreszenzmikroskopie wurden Objektträger mit vier bzw. acht aufgesetzten Kammern verwendet. Die Antikörper-Inkubationen (je 1 : 100 in PBS verdünnt) fanden in Gesamtvolumina von 200 bzw. 100 µl in der feuchten Kammer statt. Die Waschschrte der Immunfluoreszenzfärbung wurden mit eiskalten Lösungen (PBS) unter leichtem Schütteln in den Kammern oder Nöpfen durchgeführt.

Die Zellen wurden für 20 min mit 4 % Paraformaldehyd bei RT fixiert. Dann wurden sie 20 min mit 5 %igem BSA bei RT inkubiert, um die unspezifischen Bindungsstellen, die durch die Fixierung generiert werden, zu blockieren. Zur Färbung von Oberflächenantigenen wurden die Zellen mit dem jeweiligen Primärantikörper für 1 h auf Eis oder ÜN inkubiert und nach zwei Waschschrten mit PBS anschließend für 45 min mit dem entsprechenden Sekundärantikörper. Bei Doppelfärbungen mit verschiedenen Primär- und Sekundärantikörpern erfolgten die beiden Färbungen nacheinander. Die Antikörper wurden dabei in der Regel 1 : 100 bis 1 : 200 verdünnt. Auf die Kammerobjektträger wurde nach Entfernen der Kammern und Eindecken mit Mowiol ein großes Deckglas aufgelegt.

Bei Färbung intrazelluläre Antigene wurden die Zellen ebenso mit 4 % PFA für 20 min bei RT fixiert und dann zur Permeabilisierung 10 min mit 200 µl 0,1 % Triton X100 (in PBS) behandelt. Anschließend wurden sie gewaschen und für 20 min bei RT mit 5 % BSA (in PBS) inkubiert, um wiederum die unspezifischen Bindungsstellen, die durch die Fixierung generiert werden, zu blockieren. Die restliche Färbung erfolgte dann nach dem oben beschriebenen Schema.

Die Auswertung wurde an einem Fluoreszenz-Mikroskop oder am konfokalen Mikroskop der Fa. Leitz mit eingebauter Fotoeinheit vorgenommen.

3.3.3 AK-Labeling mit AlexaFluor® 488 (Monoclonal Antibody Labeling Kit)

Mit Hilfe des Kits wurden 100 µg des monoklonalen AK K41 direkt markiert, wobei die dazu benötigten Lösungen und Säulen mitgeliefert wurden. Dazu wurde eine 1 M NaHCO₃-Lösung hergestellt, indem 84 mg NaHCO₃ in 1 ml dH₂O gelöst wurden. Das Ganze wurde bis zur vollständigen Auflösung gevortext und bei 4 °C gelagert. 100 µl des AK (1 mg/ml in PBS) wurden anschließend mit 100 µl der 1 M NaHCO₃-Lösung vermischt und in das auf Eis gekühlte Eppendorf-cap mit 1 ml des Reactive Dyes transferiert, um dann nach mehrmaligem Invertieren 1 h bei RT inkubiert zu werden. Die Zugabe der NaHCO₃-Lösung sollte dabei den pH-Wert des Reaktionsmixes auf ca. pH 8,0 erhöhen, da Succinimidylester nur bei leicht alkalischem pH mit primären Aminen reagieren. Alle 10 - 15 min musste die Lösung vorsichtig invertiert werden, um die Labelingeffizienz zu erhöhen.

Währenddessen wurde eine Zentrifugationssäule in einem FACS-Röhrchen befestigt und der Säuleninhalt leicht umgerührt. Dazu wurde 1 ml der Lösung C auf die Zentrifugationssäule gegeben und diese setzen gelassen. Danach wurde weiterhin solange Flüssigkeit auf die Säule gegeben bis das Gesamtvolumen 1,5 ml betrug. Dann wurde diese trocken laufen gelassen und die letzten Tropfen der Lösung mit Hilfe eines Spritzenstopfens durch Druck herausgepresst.

Nun wurde die Zentrifugationssäule in einer der Sammelgefäße platziert und für 3 min bei 1.100 x g in einem Ausschwing-Rotor zentrifugiert, um die Säule für die Aufreinigung des konjugierten AK vorzubereiten.

Schließlich wurden 100 µl des Reaktionsansatzes tropfenweise auf die Mitte der Säule pipettiert und die Lösung konnte an das Gel in der Säule absorbieren. Dann wurde die Zentrifugationssäule in ein leeres Eppendorf-cap gestellt und für 5 min bei 1.100 x g zentrifugiert. Danach befand sich das markierte Protein in ca. 100 µl PBS (pH 7,2) im Röhrchen.

3.3.4 Färbungen für die Rasterelektronenmikroskopie (REM)

Dazu wurden 1 - 2 x 10⁵ Vero-Zellen in 12-well-Platten, die Glas-coverslips enthielten, ausgesät, damit sie am nächsten Tag zu ca. 70 % konfluent waren. Dann wurden die Glas-coverslips entweder bei 37 °C oder bei 4 °C 2 h mit 15 µg/ml mAK K41 oder ohne mAK K41 inkubiert. Danach wurden die Zellen auf den Glas-coverslips mit 1 ml PBS kurz gewaschen und 20 min bei RT mit einer Lösung aus 6,25 % Glutaraldehyd und 60 mM Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) fixiert. Anschließend wurde ÜN bei 4 °C weiterfixiert und am nächsten Tag mit PBS gewaschen. Die Überführung der Objekte in die nächste Lösung erfolgte durch Abpipettierung der vorhergehenden Lösung und sofortiges Nachfüllen der nächsten. Dabei musste in den Entwässerungsstufen beim Entfernen der Lösung unbedingt ein Flüssigkeitsrest im Gefäß zurückbleiben, um ein Austrocknen der Zellen zu vermeiden. Es folgte fünfmaliges Waschen mit Sörensen-Phosphatpuffer (pH 7,4) für 5 min, um dann mit dem ersten Entwässerungsschritt mit 30 % Aceton (in dH₂O) für 10 min zu beginnen. Dann wurden für jeweils 10 min 50 %, 75 %, 90 % (in dH₂O) und letztlich 5 Mal 100 % Aceton dazugegeben. Zum Schluss wurde das Präparat solange in 100%igem Aceton aufbewahrt, bis die getrockneten Proben auf den Tellern montiert waren. Schließlich wurden die REM-Präparate mit Gold beschichtet (Sputtern) und letztlich im REM analysiert.

3.3.5 Färbung mit Kristallviolettlösung

Die Zellen wurden mit 0,1 % Kristallviolett in 20 %iger Ethanollösung 3 min gefärbt. Zuvor waren diese mit Virus in einer bestimmten MOI infiziert worden. Anschließend wurde die Färbelösung entfernt und die Zellen in drei Waschschritten mit PBS gewaschen, um dann auf dem Kopf stehend zu trocknen. Als positiv gewertet wurden im Anschluss diejenigen wells, in denen auf der 96-well-Platte noch Plaques zu sehen waren.

3.4 Molekularbiologische Methoden

3.4.1 Herstellung kompetenter Bakterien

500 ml Bakterienmedium wurden mit 1 ml Bakteriensuspension aus einer frischen E.coli- Vorkultur (XL-10 Gold) angeimpft und bei 37 °C in einem Bakterienschüttler inkubiert. Um die Bakterien in der logarithmischen Phase zu erhalten wurde die Bakteriendichte regelmäßig kontrolliert und die Inkubation bei einer optischen Dichte von 0,4 - 0,6 OD600 abgebrochen. Alle weiteren Schritte fanden bei 4 °C mit vorgekühlten Geräten statt. Die Bakteriensuspension wurde 10 min auf 4 °C gekühlt und mit 3.000 x g für 15 min bei 4 °C abzentrifugiert. Dieses Pellet wurde dann in 200 ml einer eiskalten 0,1 M MgCl₂-Lösung aufgenommen und erneut abzentrifugiert. Das zweite Pellet wurde in 200 ml eiskalter 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und 30 min bei 4 °C inkubiert. Nach nochmaliger Zentrifugation bei 3.000 x g wurde das Zellpellet in 15 ml einer eiskalten, frischen 0,1 M CaCl₂-Lösung aufgenommen und mit 2,5 ml eiskaltem Glycerin vermischt. Die kompetenten Bakterien wurden aliquotiert, in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70 °C gelagert.

3.4.2 Transformation von Bakterien

50 µl kompetente XL-10 Gold E.coli- Bakterien wurden auf Eis aufgetaut und in ein vorgekühltes Eppendorf-cap überführt, mit 1 µg DNA vermischt und 30 min auf Eis inkubiert.

Danach wurden die Bakterien 2 min bei 42 °C behandelt und anschließend wieder 5 min auf Eis inkubiert.

Letztlich wurde das Gemisch in 950 µl LB-Medium aufgenommen und 50 µl davon auf einer Agarplatte mit Antibiotikum ausplattiert. Die Platten wurden schließlich bei 37 °C ÜN im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag die Kolonien gepickt.

3.4.3 QIAGEN Plasmid Midi/Maxi Kit

Kolonien von selektiven Agarplatten wurden gepickt und für eine Midiprep 25 ml (für eine Maxiprep 100 ml) inokuliert, die ÜN bei 37 °C geschüttelt wurden (ca. 200 rpm). Am nächsten Tag wurde die ÜN-Kultur in 50 ml-Falconröhrchen überführt und bei 4.000 rpm 15 min bei 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde dann in 4 ml (bzw. 10 ml bei Maxiprep) P1-Puffer resuspendiert und wiederum mit 4 ml (bzw. 10 ml bei Maxiprep) P2-Puffer versetzt, das die Bakterien alkalisch lysiert. Das Ganze wurde durch vier- bis sechsmaliges Invertieren leicht vermischt und 5 min bei RT inkubiert.

Dann wurden 4 ml (bzw. 10 ml bei Maxiprep) P3-Puffer mit der Lösung durch vier- bis sechsmaliges Invertieren vermischt und 15 min (bzw. 20 min bei Maxiprep) auf Eis inkubiert, um die Reaktion zu neutralisieren.

Anschließend wurde das Gemisch durch eine Mullbinde gefiltert und die QIAGEN-Säule 100 (bzw. QIAGEN-Säule 500 bei Maxiprep) equilibriert indem 4 ml (bzw. 10 ml bei Maxiprep) QBT-Puffer auf die Säule gegeben wurden. Nachdem der Puffer durch diese komplett hindurch gelaufen war, wurde der gefilterte Überstand auf die Säule pipettiert und diese anschließend zweimal mit 10 ml (bzw. 30 ml bei Maxiprep) QC-Puffer gewaschen.

Um die DNA von der Säulenmatrix zu eluieren wurden 5 ml (bzw. 15 ml bei Maxiprep) QF-Puffer aufgetragen und durch Zugabe von 3,5 ml (bzw. 10,5 ml bei Maxiprep) Isopropanol (RT) die DNA prezipitiert. Dann wurde das Gemisch bei 4.000 rpm und 4 °C für 60 min zentrifugiert und das Pellet mit 2 ml (bzw. 5 ml bei Maxiprep) 70 % Ethanol überschichtet und noch einmal bei 4.000 rpm und 4 °C für 60 min zentrifugiert.

Schließlich wurde das Pellet für 5 - 10 min luftgetrocknet und die DNA in 100 µl Elutionspuffer (oder dH₂O) aufgenommen.

3.4.4 Midi-Plasmid-Präparation (modifiziert nach Sambrook et al., 1989)

In einer Vorkultur wurden 50 ml LB-Medium mit 50 µl Ampicillin versetzt und ÜN bei 37 °C geschüttelt. Die ÜN-Kultur wurde in Falconröhrchen überführt und 8 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 5 ml Sol A resuspendiert und mit einer Spatelspitze Lysozym vermischt, geschwenkt und 10 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurden 7,5 ml Sol C zu der Mischung gegeben, leicht geschüttelt und 10 min auf Eis inkubiert. Nachdem der Ansatz 30 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert worden war, wurde der Überstand durch eine Mullbinde in ein neues Falconröhrchen überführt und mit 12 ml Isopropanol (RT) vermischt. Das Pellet wurde nach 10 min Zentrifugation bei 4.000 rpm und 4 °C in 2 ml dH₂O gelöst und mit 2 ml 5 M LiCl/50 mM Tris-HCl (pH 7,5; RT) versetzt, um dann 15 min auf Eis inkubiert zu werden. Das Gemisch wurde anschließend bei 4.000 rpm und 4 °C 15 min zentrifugiert und der Überstand in ein neues Falconröhrchen mit 10 ml Ethanol (-20 °C) überführt. Nach einer Inkubation von mindestens 2 h bei -20 °C (evtl. ÜN) wurde der Ansatz 10 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde in 400 µl dH₂O aufgenommen und in Eppendorfcaps überführt.

Um nun die RNA zu entfernen, wurden 5 µl eines RNase-Stocks (10 mg/ml) zu dem Gemisch gegeben und 30 min bei 37 °C inkubiert. Nun wurden 400 µl Phenol/Chloroform dazugegeben und 2 min gevortext. Nachdem der Ansatz 5 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert worden war, wurde die obere Phase in ein neues Eppendorf-cap überführt und die letzten Schritte wiederholt. Weiterhin wurden 400 µl Chloroform/Isoamylalkohol (24 : 1) zugegeben, 2 min vermischt und 5 min bei 13.000 rpm und RT zentrifugiert, um wiederum die obere Phase in ein neues Eppendorf-cap zu überführen. Auch dieser Schritt wurde ein weiteres Mal wiederholt. Die obere Phase wurde mit 40 µl 3 M NaAc (pH 5,2) und 1 ml absolutem Ethanol (-20 °C) versetzt, vermischt und bei -20 °C 1 - 2 h (evtl. ÜN) inkubiert. Nachdem 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert worden war, wurde das Pellet mit 1 ml 70 % Ethanol gewaschen und wiederum 5 min bei 13.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Das Pellet wurde luftgetrocknet und in 100 µl dH₂O aufgenommen.

3.4.5 QIAprep Spin Miniprep-Kit

Dazu wurden 5 ml der ÜN-Bakterienkultur in ein Falconröhrchen überführt und bei 3.000 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet in 250 µl P1-Puffer resuspendiert, in ein Eppendorf-cap überführt und mit 250 µl P2-Puffer vermischt. Das Gemisch wurde 4 - 6 Mal invertiert und mit 350 µl N3-Puffer versehen, um dann noch 4 - 6 Mal invertiert zu werden. Dann wurde die milchige Lösung bei 13.000 rpm 10 min bei 21 °C zentrifugiert und der Durchfluss auf die Säule gegeben.

Nach 30 sec des Zentrifugierens wurde die Säule mit 750 µl PE-Puffer 30 sec bei 13.000 rpm gewaschen, der Überstand verworfen und die Säule noch einmal für 30 sec bei 13.000 rpm zentrifugiert.

Die Säule wurde in ein sauberes Eppendorf-cap gegeben und mit 50 µl Elutionspuffer 1 min inkubiert, um dann 30 sec bei 13.000 rpm die DNA herunter zu zentrifugieren.

3.4.6 Bestimmung von Nukleinsäurekonzentrationen

Die Konzentration einer Nukleinsäurelösung kann photometrisch bestimmt werden, wenn diese Lösung weitgehend frei von Verunreinigungen (Phenol, Agarose, PEG u.a. Nukleinsäuren) ist.

Über die Messung der Extinktion bei einer Wellenlänge von 260 nm (Ultraviolettbereich) gegenüber einer Kontrolllösung von 80 µl aqua dest. erhält man die Nukleinsäurekonzentration unter der Annahme folgender Werte:

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

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

Durch Einrechnung der eingesetzten Verdünnungsstufe erhält man die Nukleinsäurekonzentrationen. Der Grad der Verunreinigung durch Proteine kann durch Messung der Extinktion bei 280 nm festgestellt werden. Das Verhältnis OD₂₆₀/OD₂₈₀ gibt den Reinheitsgrad der Nukleinsäure wieder. Reine DNA-Präparationen besitzen einen Quotienten von 1,8 und 2,0.

Für die Messungen wurden 3 µl der Nukleinsäurelösung mit dH₂O auf 73 µl aufgefüllt und in UVetten, Kuvetten, die ultraviolettes Licht durchlassen können, vermessen.

3.4.7 Sequenzierung

Zur Sequenzierung und Bestimmung der Richtigkeit bestimmter Sequenzfolgen von Plasmiden oder Klonen wurde der "ABI PRISM 310 Genetic Analyzer" verwendet.

Zunächst wurde die zu sequenzierende DNA mit Hilfe von Taq-Polymerase, entsprechender Primer und einem Gemisch aus unmarkierten dNTPs und fluorochrommarkierten ddNTPs in der PCR-Maschine amplifiziert und markiert. Da jedes der vier ddNTPs mit einem anderen Fluorochrom markiert ist, findet die Kettenabbruchreaktion in einem Ansatz statt. Nach Ablauf der Reaktion befinden sich im Reaktionsgefäß DNA-Fragment-Populationen unterschiedlicher Länge, wobei die Fragmente gleicher Länge an der Abbruchstelle mit dem gleichen Farbstoff markiert sind. Nach Auftrennung dieser Fragmente entsprechend ihrer Größe in der Kapillargelelektrophorese kann die Sequenz durch Detektion des emittierten Lichts bestimmt und mittels der gekoppelten Software analysiert werden.

Die Sequenzierung wurde folgendermaßen angesetzt:

2 µl Plasmid-DNA (50 ng/µl)

1 µl der entsprechenden Sequenzierprimer (5 pmol) (siehe 2.5)

1 µl 5 x-BDT-Puffer

1 µl BDH

Der Einbau der fluorochrommarkierten ddNTPs für die one-lane-Sequenzierreaktion erfolgte für 29 Zyklen in der PCR-Maschine unter folgenden Bedingungen:

96 °C: 30 sec

50 °C: 15 sec

60 °C: 4 min

Anschließend wurde die Sequenzierreaktion bis zur automatischen Sequenzierung bei 4 °C gelagert.

3.4.8 Gelelektrophorese von Nukleinsäuren

Die Gelelektrophorese dient zur Analyse und Kontrolle von Plasmid-DNA-Präparationen, PCR-Amplifikationen und Restriktionsverdaus. Diese Methode nutzt die unterschiedlichen Laufgeschwindigkeiten negativ geladener Moleküle in einer Agarosematrix, an die ein elektrisches Feld angelegt wird (Sambrook et al. 1989). Kleinere Fragmente der negativ geladenen Nukleinsäuren finden sich nach Anlage eines elektrischen Feldes über eine bestimmte Zeiteinheit anodennäher als größere Fragmente.

Hierzu wurden 1 %, bei der Analyse von kleineren Fragmenten bis zu 2 % (w/v), Agarose als Pulver in 120 ml TAE-Puffer in der Mikrowelle für 2 min gekocht, bis keine Schlieren mehr zu sehen waren. Nach Abkühlung auf ca. 50 °C und Zugabe einer Ethidiumbromidlösung zu einer Endkonzentration von 1 µg/ml wurde die Lösung in einen Gelträger gegossen, der mit einem entsprechenden Kamm zur Erzeugung der Auftragstaschen versehen war. Nach Polymerisation der Agaroselösung wurde der Kamm vorsichtig entfernt, der Gelschlitten in die Elektrophoreseapparatur eingesetzt, mit Elektrophorese-Puffer (1 x TAE) aufgefüllt und das Gel mit den DNA-

Proben, die zuvor mit 1/10 Vol 10 fachem Ladepuffer versehen wurden, beladen. Nach der elektrophoretischen Auftrennung bei 110 V wurden die entsprechend ihrer Größe aufgetrennten DNA-Moleküle im UV-Licht sichtbar gemacht und fotografiert bzw. für die Gelisolation aus dem Gel herausgeschnitten.

3.4.9 Polymerase-Kettenreaktion (PCR)

Die 1985 publizierte Methode der Polymerase-Kettenreaktion (Saiki et al. 1985) dient zum Nachweis bestimmter Sequenzen in einem cDNA-Gemisch. Die einzelnen temperaturabhängigen Schritte der Denaturierung, des Annealings und der Extension werden nach entsprechender manueller Programmierung eines Thermocyclers automatisch vorgegeben und ausgeführt. Unter Verwendung einer Taq-Polymerase wurde mit Hilfe der spezifischen Primer in den einzelnen Ansätzen der entsprechende Abschnitt des viralen Genoms amplifiziert. Die PCR-Ansätze wurden wie folgt auf ein Gesamtvolumen von 25 µl zusammenpipettiert:

0,1 µg DNA
 1,0 µl "upper primer" (25 pM)
 1,0 µl "lower primer" (25 pM)
 add 25 µl dH₂O

Die Ansätze wurden gemischt, kurz zentrifugiert und mit einem puReTaq Ready-To-Go PCR bead von Amersham Biosciences vermischt. Diese Kügelchen enthalten 10 x Taq-Puffer, Taq-Polymerase, 200 µM dNTP-Mix, 1,5 mM MgCl₂, 50 mM KCl und 10 mM Tris-HCl (pH 9, RT).

In der PCR-Maschine wurde mit folgendem Programm amplifiziert:

1x:	94 °C	2 min
	53 °C	1-X min (Annealing; ca. 1 - 5 °C unter der T _M der Primer)
	72 °C	2 min (Extension; pro 1000 bp je 1 min)
35x:	94 °C	30 sec (Denaturierung)
	53 °C	1-X min (Annealing; ca. 1 - 5 °C unter der T _M der Primer)
	72 °C	2 min (Extension; pro 1000 bp je 1 min)
1x:	72 °C	7 min

Anschließend wurden im 1 %igen Agarosegel je 10 µl der PCR-Reaktionen aufgetragen und untersucht.

3.4.10 Restriktionsverdau

Die Restriktionsspaltung von DNA fand in folgenden 20 µl-Ansätzen für 60 min bei 37 °C statt, wobei zuerst das Wasser, und anschließend in Reihenfolge der Puffer, die DNA und zum Schluss das Enzym in das Eppendorf-cap pipettiert wurden:

1 µg DNA
 2 µl 10 x RE-Puffer
 10 U RE (bzw. 2 x 5 U bei Doppelverdau)
 dH₂O ad 20 µl

Die Enzymaktivität wurde durch zehninütiges Erhitzen auf 75 °C im Heizblock inaktiviert.

3.4.11 Auffüllen überhängender Enden mit Klenow-Polymerase

Bei der Klenow-Polymerase handelt es sich um das große Fragment der E. coli DNA-Polymerase I mit 5' → 3'-Polymerase- und 3' → 5'-Exonuklease-Aktivität, bei dem die 5' → 3'-Exonuklease-Aktivität der Polymerase I durch Substitution mit dem maltosebindenden Protein inaktiviert wurde. Das Enzym wurde in folgendem Ansatz zum Auffüllen kohäsiver Enden in Vorbereitung auf die Ligation glatter Enden verwendet:

- 1 µg DNA
- 2 µl 10 x RE-Puffer
- 2 µl 40 mM dNTP-Mix
- 1 µl (5 U) Klenow-Polymerase
- dH₂O add 20 µl

Der Reaktionsansatz wurde für 15 min bei 25 °C inkubiert. Anschließend wurde die Enzymaktivität durch zehninütiges Erhitzen auf 75 °C inaktiviert.

3.4.12 Dephosphorylierung von Plasmidvektoren

Zur Verhinderung von Religation wurden 2 µg der restriktionsverdauten Plasmidvektoren mit "Calf intestine phosphatase" (CIP) in 100 µl-Reaktionen für 60 min bei 37 °C 5'-dephosphoryliert:

- 20 µl (2 µg) des restriktionsverdauten Plasmids
- 10 µl 10 x CIP-Puffer
- 2 µl (20 U) CIP
- 68 µl dH₂O

Anschließend wurde die Enzymaktivität durch zehninütiges Erhitzen auf 75 °C inaktiviert.

3.4.13 Ligation

Für die Ligation kohäsiver Enden wurde bei ungleicher Länge des Vektors/ Inserts der dephosphorylierte Vektor mit dem Insert im molaren Verhältnis von 1 : 1 oder 1 : 2 eingesetzt, während bei gleicher Länge des Vektors/ Inserts das Verhältnis von 1 : 3 eingesetzt wurde. Dabei überstieg der Gesamt-DNA-Gehalt der Reaktion 1 µg nicht und es wurden 1 - 5 Units T4-DNA-Ligase in 3 µl 10xfachem Ligationspuffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl bei 4 - 16 °C ÜN inkubiert.

Für die Ligation glatter Enden wurde das Insert mit dem dephosphorylierten Vektor im molaren Verhältnis von 5 : 1 (Gesamt-DNA-Gehalt der Reaktion: maximal 1 µg) vermischt und mit 1 - 5 U T4-DNA-Ligase in 3 µl 10xfachem Ligationspuffer in einem Gesamtvolumen von 30 µl für 24 h bei RT inkubiert.

3.4.14 Ethanolfällung

Es werden 1/10 (bezogen auf das Gesamtvolumen) 3 M Natriumacetat sowie 2,5 Vol (bezogen auf das Gesamtvolumen) 100 % Ethanol zum Ansatz gegeben und durch vortexen vermischt. Nach 1 min wird das Gemisch bei 13.000 rpm 20 min lang zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nun werden 250 µl 70 % Ethanol auf das Pellet gegeben (nicht vortexen), um dann 10 min bei 13.000 rpm zentrifugiert zu werden. Der Überstand wurde verworfen und das Pellet 5 min luftgetrocknet, um jegliche Ethanolreste zu entfernen. Letztlich wurde das Pellet in 40 µl dH₂O oder Elutionspuffer aufgenommen.

3.4.15 Reverse Transkription von mRNA

Im ersten Schritt findet die Bindung von Desoxythymidin-Oligonukleotiden an das polyadenylierte Ende des heterogenen Gemischs aus mRNA statt. Hierzu wurde die aus Zelllysaten isolierte mRNA in dem nun folgenden Ansatz für 5 min auf 65 °C erhitzt, um dann schnell auf Eis abgekühlt zu werden:

- 1 - 5 ng RNA
- 1 µl Oligo(dT)12 - 18 Primer
- 1 µl 10 mM dNTP Mix
- Add 12 µl steriles a.dest

Anschließend wurden zu dem Gemisch noch folgende Substanzen zugegeben und 2 min bei 42 °C inkubiert:

- 4 µl 5 xfach RT-Puffer
- 2 µl 0,1 M DTT
- 1 µl steriles a.dest

Letztlich wurden dann 1 µl der reversen Transkriptase SuperScript dazu pipettiert und 50 min bei 42 °C im Wasserbad inkubiert, um die isolierte mRNA in einzelsträngige, komplementäre cDNA umzuschreiben. Nun kann durch die reverse Transkriptase eine Kopie der Nukleinsäuresequenz in Form stabiler cDNA erzeugt werden. Danach wurde die reverse Transkriptase noch 15 min bei 70 °C inaktiviert und schnell auf Eis abgekühlt. Die generierte cDNA wurde bei -20 °C eingefroren.

3.4.16 Gel-Extraktion von DNA-Fragmenten (Quiaquick Gel extraction Kit)

Um DNA-Stücke aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurde das DNA-Fragment mit einem scharfen Skalpell und einem Minimum an Agarose ausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen und 3 Volumina des QG-Puffers zu 1 Volumen des Gels dazugegeben (100 mg ≈ 100 µl). Das Ganze wurde solange bei 50 °C inkubiert, bis sich das Gel auflöste - alle 2 - 3 min wurde gevortext. Nun sollte die Flüssigkeit gelb sein (falls sie orange/violett ist: 10 µl 3 M NaAc dazugeben und mischen). Anschließend wurde 1 Gelvolumen Isopropanol dazugegeben, vermischt und alles auf die DNA - Bindende Säule gegeben, die dann 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde. Der Durchfluss wurde verworfen und 0,5 ml QG-Puffer auf die Säule pipettiert. Nachdem der Puffer 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert wurde, um die Agarosereste zu entfernen, wurde die Säule mit 0,75 ml PE-Puffer 1 min bei 13.000 rpm gewaschen. Der Durchfluss wurde verworfen und die Säule nochmals bei 13.000 rpm 1 min zentrifugiert. Um die DNA zu eluieren wurden 50 µl EB-Puffer auf die Mitte der Säulenmatrix aufgetragen, für 1 min stehen gelassen und anschließend 1 min bei 13.000 rpm zentrifugiert.

3.4.17 Gel-Extraktion von DNA-Fragmenten durch Glasmilch-Kit (NucleoTrap kit)

Um DNA-Stücke aus einem Agarosegel zu extrahieren, wurde das DNA-Fragment mit einem scharfen Skalpell und einem Minimum an Agarose ausgeschnitten. Das Gelstück wurde gewogen und 3 Volumina des Lysis-Puffers NT1 zu 1 Volumen des Gels dazugegeben (100 mg ≈ 300 µl NT1). Nachdem die Lösung sorgfältig vermischt worden war, wurden dann für jedes µg DNA je 4 µl NucleoTrap Lösung (Glasmilch) dazugegeben, mindestens aber 10 µl, und bei 50 °C 10 - 15 min gevortext, um das Gelfragment aufzulösen. Danach wurde 30 sec bei 10.000 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Um die Matrix mit der gebundenen DNA zu waschen, wurden 500 µl NT2-Puffer dazugegeben, gevortext und wiederum 30 sec bei 10.000 x g zentrifugiert. Nachdem der Überstand komplett entfernt worden war, wurden 500 µl NT3-Puffer zum Pellet gegeben, gevortext und 30 sec bei 10.000 x g zentrifugiert, um abermals den Überstand abzunehmen. Der letzte Waschschrift wurde noch einmal wiederholt und die Silica-Matrix bei RT oder 37 °C im Heizblock für 10 - 15 min getrocknet.

Letztlich wurden 25 - 50 µl Elutionspuffer NE mit dem Pellet resuspendiert und für 10 - 15 min bei RT inkubiert. Alle 2 - 3 min wurde das Gemisch invertiert und dann 30 sec bei 10.000 x g zentrifugiert. Die im Überstand enthaltene DNA wurde in ein sauberes Reaktionsgefäß überführt. Bei größeren Fragmenten (> 5 - 10 kb) wurde die Ausbeute deutlich verbessert, indem die Inkubation bei 55 °C ablief.

3.4.18 RNA-Isolation (GenElute Mammalian Total RNA Isolation Kit)

Um bestimmte Virusgene für die Klonierung in Vektoren zu isolieren, muss zunächst das gesamte, in den mit Dengue Virus infizierten Zellen existierende RNA-Gemisch extrahiert und isoliert werden. Die Isolation wurde mit dem GenElute™ Mammalian Total RNA Purification Kit durchgeführt, die entsprechend RNase-freien Lösungen und Puffer sind dabei gebrauchsfertig vorhanden.

Bis zu 5×10^6 Zellen wurden zuerst mit 250 µl Lysepuffer und dem zuvor frisch dazugegebenen β-Mercapthoethanol (10 µl/ml) gut vermischt und anschließend in die vorgegebenen blauen Filtersäulen pipettiert. Nach einem Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 2 min wurde der blaue Filteransatz, in dem sich Zelldebris befindet, verworfen und das Filtrat mit dem gleichen Volumen an 70%igem Ethanol (v/v) gut invertiert. Nun wurden 700 µl des Lysat-Ethanol-Gemisches auf die klare Filtersäule gegeben und 15 sec bei 13.000 rpm abzentrifugiert, wobei die Gesamt-RNA im Filter gebunden wurde. Nachdem die abzentrifugierte Lösung verworfen wurde, folgten ein Waschschriff mit Waschlösung 1 und zwei mit Waschlösung 2, wobei nach jedem Waschschriff ein neues Sammelgefäß verwendet wurde. Bei den ersten beiden Waschschriffen ist eine Zentrifugation bei 13.000 rpm für 15 sec ausreichend, wobei der letzte Schriff für 2 min bei 13.000 rpm ausgeführt wurde. Nachdem die klare Säule nun in ein neues Sammelgefäß überführt und mit 50 µl Elutionspuffer benetzt wurde, befindet sich die RNA nach einem weiteren Zentrifugationsschritt bei 13.000 rpm für 1 min im Zentrifugat. Eine Lagerung der extrahierten DNA bei -20 °C bis 80 °C wurde vorgenommen.

3.4.19 Gezielte Mutagenese (QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit)

Die Methode dieses Kits beruht auf 3 Schritten:

- 1.) Zuerst wird der Mutantenstrang synthetisiert, indem man anhand einer PCR zuerst das DNA-template denaturiert, dann das Annealing der Primer mit der gewünschten Mutation veranlasst und letztlich die Primer anhand der *PfuUltra*-DNA-Polymerase zu einem mutierten Plasmid verlängert.
- 2.) Durch den Verdau mit DpnI werden parental hemimethylierte und methylierte DNA-Stränge zerstört und nur die Mutation enthaltenden DNA-Stränge werden selektiert.
- 3.) Schließlich werden die mutierten Moleküle in superkompetente XL1-Blue Zellen transformiert.

Zuerst wurde die Kontroll-Reaktion für die PCR angesetzt:

- 5,0 µl 10 x Reaktionspuffer
- 2,0 µl (10 ng) des pWhitescript 4.5-kb Kontroll-Plasmid (5 ng/µl)
- 1,25 µl (125 ng) des Oligonucleotid-Kontroll-Primers #1 [34mer (100 ng/µl)]
- 1,25 µl (125 ng) des Oligonucleotid-Kontroll-Primers #2 [34mer (100 ng/µl)]
- 1,0 µl des dNTP Mix
- 38,5 µl ddH₂O (um auf insgesamt 50 µl Gesamtvolumen zu kommen)
- 1,0 µl *PfuUltra* HF DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Dann wurden die anderen Reaktionen folgendermaßen angesetzt:

- 5 µl 10 x Reaktionspuffer
- X µl (5 - 50 ng) des dsDNA-Template
- X µl (125 ng) des mutierten Oligonucleotid-Primers #1
- X µl (125 ng) des mutierten Oligonucleotid-Primers #2
- 1,0 µl des dNTP Mix
- ddH₂O add 50 µl
- 1,0 µl *PfuUltra* HF DNA Polymerase (2,5 U/µl)

Nun wurden beide Reaktionsansätze in der PCR-Maschine mit folgendem Programm amplifiziert:

- | | | |
|--------------|-------|---|
| 1 x: | 95 °C | 30 sec |
| 12 x: | 95 °C | 30 sec (Denaturierung) |
| | 55 °C | 1 min (Annealing) |
| | 68 °C | 1 min/kb der Plasmid-Länge (Polymerisation) |

Für die Kontrollreaktion wurden 5 min Polymerisation und 12 Zyklen gefahren.

Am Ende der PCR wurde die Reaktion für 2 min auf Eis gestellt, um sie auf ≤ 37 °C abzukühlen.

Im zweiten Schritt wurden nun zum PCR-Ansatz 1 µl des Restriktionsenzym Dpn I (10 U/µl) gegeben und leicht vermischt. Der Reaktionsansatz wurde kurz herunter zentrifugiert und bei 37 °C für 1 h inkubiert, um die parentale supercoiled dsDNA zu verdauen.

Im dritten Schritt wurden die XL1-Blue superkompetenten Zellen auf Eis aufgetaut und für jede Reaktion 50 µl davon in ein separates Eppendorf-cap pipettiert. Dann wurden 1 µl der Dpn I behandelten DNA und der Kontrollreaktion in die kompetenten Zellen gegeben und vermischt sowie 30 min auf Eis inkubiert.

Schließlich wurden die Zellen durch eine Hitzeschockreaktion für 45 sec bei 42 °C behandelt und danach für 2 min wieder auf Eis inkubiert. Nun wurden 0,5 ml LB-Medium zu den Bakterien gegeben und für 1 h bei 37 °C in einer Vorkultur geschüttelt (bei 225 - 250 rpm). Letztlich wurden 50 µl der Transformationsreaktion auf Agarplatten ausgestrichen, die Ampicillin als Selektionsantibiotikum für die Plasmidvektoren besitzen.

Für die Mutagenese-Kontrolle wurden 250 µl der Zellen auf LB-Ampicillinplatten mit 80 µg/ml X-gal und 20 mM IPTG ausplattiert. Diese wurden dann ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert und am nächsten Tag die Kolonien gezählt.

3.5 Proteinbiochemische Methoden

3.5.1 Aufreinigung von monoklonalen Antikörpern

Die antikörperhaltigen Überstände der Hybridomzellkultur wurden bis zu ihrer Verwendung auf 4 °C gelagert. Bei einem Gesamtvolumen von mindestens 500 ml bis 750 ml wurden die Überstände für 15 min bei 4.000 rpm und 4 °C zentrifugiert, um noch vorhandene Zellen und Zellbruchstücke zu pelletieren. Anschließend wurde der Überstand mit Hilfe eines Membranfilters mit 0,2 µm Porengröße steril filtriert, um dann im Kühlraum bei 4 °C ÜN zirkulär über eine Protein-G-Sepharose-Säule gepumpt zu werden. Zuvor wurde die 20 %ige Ethanollösung von der Säule entfernt und durch Waschpuffer A (pH 7,4) ersetzt. Dieser soll in zwei Waschschritten je 20 min die Proteinsäule spülen und equilibrieren. Anschließend wurde die Antikörperlösung mindestens 24 h zirkulär über die Säule laufen gelassen, um dann wieder mit Waschpuffer A beladen zu werden. Nachdem der Waschpuffer durchgelaufen war, wurden die an Protein G gebundenen Antikörper unter Verwendung eines sauren Elutionspuffers 0,1 M (pH 2,7) von der Säule eluiert und in Röhrchen mit jeweils 0,5 ml vorgelegter basischer Tris-Lösung 1M (pH 8,9) aufgefangen. Nachdem 5 ml des Antikörpers in das Röhrchen getropft sind, wurde dieses sofort durch Schütteln gut vermischt, um das saure Niveau des Elutionspuffers zu neutralisieren, da dieses sonst schädlich für die Antikörpermoleküle wäre. Um die Säule für die nächste Aufreinigung zu regenerieren, wurde diese noch mit Waschpuffer A für ca. 20 min gewaschen und anschließend mit 20 %igem Ethanol gespült und darin aufbewahrt. Im Anschluss wurde die erhaltene Antikörperlösung in Dialyseschläuche überführt und ÜN gegen 5 l PBS dialysiert. Nach der Aliquottierung konnte der Antikörper bei -20 °C aufbewahrt werden. Die Quantität und Qualität der Antikörpergewinnung wurde letztlich über die photometrische Messung der Proteinkonzentration und über die Immunfluoreszenz definiert.

3.5.2 Fab-Fragment-Herstellung und -Reinigung

Bevor die Präparation der Fab-Fragmente beginnen konnte, wurde zuerst das immobilisierte Papain vorbereitet, indem 0,5 ml der 50 %igen zähflüssigen Papainmasse (entspricht 0,125 ml des gesetzten Gels) in einem 16 x 150 mm Glasteströhrchen mit 4,0 ml des Verdauungspuffers vermischt wurde. Im Anschluss wurde mit Hilfe der Trennapparatur das immobilisierte Papain vom Puffer getrennt und dieser verworfen, indem die Vorrichtung komplett in das Röhrchen eingeführt und dabei das Gel leicht komprimiert wurde. Dieser Waschschriff wurde einige Male wiederholt, bevor das immobilisierte Papain durch Zugabe von 0,5 ml Verdauungspuffer equilibriert war. Nun wurde der IgG Antikörper gegen einen Puffer dialysiert, der 20 mM Natriumphosphat und 10 mM EDTA (bei pH 7,0) enthielt. Dann wurde die Antikörperlösung auf ca. 20 mg/ml konzentriert und pro 0,5 ml IgG 0,5 ml Verdauungspuffer zugegeben. Nun konnten 1,0 ml der vorbereiteten IgG-Lösung mit dem equilibrierten immobilisierten Papain vermischt und die Trennapparatur dabei im Glasröhrchen direkt über dem Reaktionsmix positioniert werden. Nach einer Inkubation von 5 h im Schüttler bei 37 °C und höchster Schüttelstufe wurde der Verdau vom immobilisierten Papain vereinzelt, indem abermals die Trennapparatur verwendet wurde. Um ein Maximum der Ausbeute vom Fragment zu gewährleisten, wurde das immobilisierte Papain mit 1,5 ml ImmunoPure® IgG Bindungspuffer gewaschen und der Überstand mit dem dekantierten Verdau vereint. Das Gesamtvolumen sollte hierbei 3,0 ml nicht überschreiten.

Zur Reinigung des Fab-Fragments wurde nun die Protein-A-Säule vorbereitet, indem die obere Schutzkappe zuerst entfernt wurde, um die Bildung von Luftbläschen im Gel zu verhindern. Anschließend wurde die Aufbewahrungslösung, die 0,02 % Natriumazid enthält, von der Säule entfernt und die untere Schutzkappe beseitigt. Nach der Equilibrierung mit 12 ml Bindungspuffer wurde die Protein A Säule auf ein 16 x 150 mm Teströhrchen platziert und 3,0 ml des Verdau auf die Gelmatrix pipettiert. Als die Lösung komplett in das Gel eingelaufen war, wurden 6,0 ml Bindungspuffer langsam aufgeschichtet. Nun wurde der Durchfluss, der die Fab-Fragmente enthält, in einem Röhrchen gesammelt und bei 4 °C bzw. in Aliquots bei -20 °C verwahrt.

Zur Regenerierung der immobilisierten Protein-A-Säule wurden zusätzlich 3,0 ml Bindungspuffer zugegeben und der Durchfluss verworfen. Nun wurden unter Verwendung eines neuen 16 x 150 mm Teströhrchens die

unverdauten IgG-Moleküle und Fc-Fragmente durch Zugabe von 6,0 ml ImmunoPure®IgG Elutionspuffer eluiert. Auch diese Fraktion wurde bei 4 °C bis zur Weiterverwendung aufbewahrt. Nach einem weiteren Waschschrift mit 10 ml Elutionspuffer wurden 10 ml einer 0,1 %igen Natriumazid (v/v) Lösung auf die Protein-A-Säule gegeben, um diese dann nach dem Durchlauf bis auf 3,0 ml mit der unteren Verschlusskappe zuerst abzudichten. Abschließend wurde die Säule auch am oberen Ende verschlossen und bei 4 °C gelagert.

3.5.3 Proteinbestimmung mittels BCA

Zur Bestimmung von Proteinkonzentrationen wird der Bicinchoninsäuretest durchgeführt, bei dem man die Reduktion von zweiwertigem zu einwertigem Kupfer durch die Anwesenheit von Proteinen nutzt. Die einwertigen Kupferionen werden dann durch Bicinchoninsäure in violetten Komplexen gebunden, deren maximale Absorption bei 562 nm liegt und gegenüber einer Proteinstandarlösung photometrisch gemessen werden kann. Dabei verhält sich der Absorptionsgrad direkt proportional zur Proteinkonzentration. Um die Konzentration eines Proteins beispielsweise für den Western Blot zu bestimmen, wurde zuerst das Reagenz, das für die Messung benötigt wird, mit 1 Teil Kupfer-II-Lösung zu 50 Teilen Bicinchoninic angesetzt. Sie bildet die Basis für die verschiedenen Probenansätze, die aus einem Standard, dem Nullwert und den Proben selbst bestehen. Dazu wurden je 2 ml Reagenz mit 10 µl Standardlösung (1 mg/ml) für den Standard, 10 µl PBS für den Nullwert und 10 µl Probe für die zu untersuchenden Lösungen vermischt, gevortext und 30 min bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die Ansätze für 5 - 10 min auf Eis abgekühlt, um dann mit den entsprechend eingegebenen Parametern automatisch am Photometer gemessen zu werden. Dabei wurde die Extinktion nach folgender Formel ermittelt und berechnet:

$$\frac{\text{Extinktion Probe}}{\text{Extinktion Standard}} \times \text{Konzentration des Standards} \times \text{Verdünnung} = \text{Konzentration in } \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

Abbildung 3.5.3.1: Formel zur Berechnung der Extinktion.

3.5.4 Herstellung von Zelllysaten für die Analyse zytoplasmatischer und membrangebundener Proteine

Spezifisch exprimierte Proteine können mit Hilfe der Western-Blot-Analyse sichtbar gemacht werden. Hierzu wurde zunächst ein proteinhaltiges Lysat der zu untersuchenden Zellen hergestellt, um das Proteingemisch, das neben den zellulären Proteinen ebenfalls Virusproteine enthalten kann, in der SDS-Polyacrylamid-gelelektrophorese auftrennen zu können. Hierzu wurden die zuvor behandelten Zellen einer 6-well-Platte zunächst zweimal mit PBS⁽⁻⁾ gewaschen und anschließend durch vorsichtiges Abspülen des Bodens sowie Abkratzen der Zellen mit einem Zellschaber in eine Zellsuspension überführt. Die Suspension wurde dann für 5 min bei 1.200 rpm und 4 °C pelletiert und in 250 µl - 500 µl NP40-Lysispuffer resuspendiert und für 45 min auf Eis inkubiert. Nach der Lyse konnten die Zellkerne für 15 min bei 13.000 rpm und 4 °C abzentrifugiert werden. Der proteinhaltige Überstand wurde am nächsten Tag für die SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese verwendet oder bei -80 °C für längere Zeit gelagert.

3.5.5 Gelelektrophorese von Proteinen

Die Gelelektrophorese dient zur Aufkonzentrierung und anschließender Auftrennung des Proteingemischs. Eingebettet in eine Polyacrylamidmatrix werden die Proteine durch die Präsenz von Natriumdodecylsulfat zylindrisch aufgefalteter, von einer negativ geladenen Hülle umgeben und elektrophoretisch nach ihrer linearen Größe aufgetrennt (Laemmli, 1970). Die Verwendung eines diskontinuierlichen Gelsystems, bestehend aus einem Sammelgel, gefolgt von einem Trenngel, erlaubt eine Aufkonzentration verschiedener Proben an der

Grenze zwischen den beiden Gelarten, die sich durch verschiedene pH-Werte unterscheiden und in denen Glycinionen in ungleichen Ladungszuständen vorliegen.

Zuerst wird das Trenngel in die vorbereitete Gelapparatur eingegossen, die aus mit Klammern fixierten Glasplatten sowie Parafilm, der ein Auslaufen des Gels verhindern soll, besteht. Hier findet die eigentliche Gelelektrophorese von Proteinen in einer Matrix mit einer Konzentration von 12 % Acryl-/Bisacrylamid statt. Für zwei mittelgroße Trenngele von je knapp 20 ml Volumen wurden folgende Reagenzien auf Eis vermischt: 16 ml Acryl-/Bisacrylamid (30 %-Lösung), 15,0 ml Tris 1 M (pH 8,8), 8,6 ml a. dest. und 400 µl SDS 10 %. Mit Zugabe von 400 µl Ammoniumpersulfat (20 %-Lösung) aus dem Kühlschrank und 100 µl TEMED wurde die Polymerisation eingeleitet. Nun wurde zügig die Trenngellösung möglichst blasenfrei bis auf etwa 4,5 cm unterhalb der Glasplattenkanten in die Ecke der mittleren Gelelektrophoreseapparatur gegossen und vorsichtig gleich im Anschluss, noch bevor das Gel trocknet, mit Butanol (1 : 1 in a.dest gemischt) überschichtet. Nach ca. 30 min bei Raumtemperatur konnte das Gel durch Waschen mit a.dest vom überschüssigen Butanol befreit und mit dem Sammelgel überschichtet werden, das aus folgenden Substanzen auf Eis zusammen pipettiert wurde: 2,5 ml Acryl-/Bisacrylamid (30 %ige Lösung), 2,5 ml Tris 1 M (pH 6,8), 14,8 ml a. dest. und 200 µl SDS (20 %ige Lösung). Durch Zugabe von 100 µl Ammoniumpersulfat (20 %ige Lösung) und 40 µl TEMED wurde erneut die Polymerisation eingeleitet und die Mischung zügig auf das Trenngel in die Ecke der Apparatur luftblasenfrei pipettiert. Zum Schluss wurde ein Kamm für die Auftragstaschen eingesetzt und nach 30 min bei Raumtemperatur konnte das Gel bereits weiter verwendet werden. Nun wurde die Gelelektrophoreseapparatur mit einfach konzentriertem Proteingellaufpuffer aufgefüllt und die Auftragstaschen mit einer mit Luft und Puffer gefüllten Spritze blasen- und gelrestefrei ausgespült. Letztlich wurden pro Auftragstasche 200 µl maximales Volumen der zu untersuchenden Proteinproben eingefüllt, die zuvor in einem Verhältnis von 1 : 4 mit 4 x-fach reduzierendem oder nicht reduzierendem SB-Puffer versetzt und für 5 min bei 95 °C erhitzt wurden. Weiterhin wurde die erste Auftragstasche mit 10 µl des Proteinmarkers (Pageruler™ Prestained Protein Ladder; Fermentas) beladen, bevor an die Apparatur eine Stromstärke von 16 mA für etwa 15 - 19 h angelegt wurde. Sobald eine übersichtliche Verteilung der Proteinstandards mit Fokus auf das zu detektierende Protein erreicht wurde, konnte das Gel nun für die Western-Blot-Analyse verwendet werden.

3.5.6 Western-Blot-Analyse

In der Western-Blot-Analyse können Proteine nun mit Hilfe eines Antikörpers nachgewiesen und ihre Größe eingeschätzt werden. Die 1979 veröffentlichte Methode (Towbin et al. 1979) wurde hier nach folgendem Schema durchgeführt: die in dem Gel aufgetrennten Proteine wurden in einem elektrischen Feld einer Blottingapparatur auf eine Nitrozellulosemembran transferiert. Dabei wurde von der unten liegenden Anode zur oben liegenden Kathode der Aufbau wie folgt vorgenommen, wobei immer darauf geachtet wurde, dass die unterschiedlichen Lagen luftblasenfrei appliziert wurden. Zuerst wurden drei mit Anode-I-Puffer getränkte Lagen Whatman-Papier auf die mit a.dest befeuchtete Graphitplatte übereinandergelegt. Es folgten zwei mit Anode-II-Puffer getränkte Lagen Whatman-Papier und eine in Anode-II-Puffer befeuchtete Nitrozellulosemembran. Anschließend wurde das in den Kathoden-III-Puffer äquilibriert Polyacrylamidgel sowie drei mit Kathoden-III-Puffer getränkte Lagen Whatman-Papier übereinander geschichtet. Schließlich wurde darauf geachtet, dass die Graphitplatten immer mit a.dest. befeuchtet bleiben (Semi-dry). Bei einer Stromstärke von $0,8 \text{ mA/cm}^2$ wurden die Proteine für ca. 60 min auf die Nitrozellulose transferiert, wobei die Übertragung des Markers als Kontrolle für den Erfolg diente. Nach dem sogenannten Blotten folgte nun das Blocken der Nitrozellulosemembran in einer Wanne mit Blockierpuffer mit je 100 ml PBS⁽⁻⁾ und 10 % Magermilchpulver pro Gel mit Hilfe eines Wippschüttlers über 4 - 6 h bei Raumtemperatur. Nach mehreren Waschschritten von etwa 15 min mit PBS⁽⁻⁾ 0,05 % Tween20 wurde die Nitrozellulosemembran mit dem spezifisch bindenden Antikörper in einer bestimmten Verdünnung (zwischen 1 : 300 bis 1 : 5000 je nach AK) in 15 ml PBS⁽⁻⁾ 0,05 % Tween20 und 5 % Magermilchpulver über Nacht bei 4 °C schwenkend inkubiert. Am darauf folgenden Tag wurden über 60 min alle 10 min mit PBS⁽⁻⁾ 0,05 % Tween20 bei RT gewaschen, um dann den mit Hilfe eines Meerrettichperoxidase gekoppelten Zweitantikörpers die Nitrozellulosemembran abermals 1 h bei RT zu inkubieren. Dabei

wurde dieser meist in einer Verdünnung von 1 : 2.000 - 1 : 5.000 eingesetzt. Danach wurde die Nitrozellulosemembran ein letztes Mal jeweils 15 min viermalig mit PBS(-) gewaschen und auf Whatman-Papier abgetropft.

Da der an die Meerrettichperoxidase gekoppelte Antikörper ein Substrat umsetzen kann, das durch die Enzymwirkung in eine Photonen emittierende Substanz umgewandelt wird, können letztlich auf diese Weise die detektierten Proteine sichtbar gemacht werden. Dazu wurden Lösungen 1 (Enhancer Solution) und 2 (Peroxid Solution) des Super Signal West Pico Kits in gleichen Teilen zu einem Volumen von etwa 7 ml gemischt und für 5 min bei RT mit der Nitrozellulosemembran in Verbindung gebracht. Nach kurzem Abtropfen auf Whatman-Papier wurde die Nitrozellulosemembran in eine Fotokassette zwischen zwei Kopierfolien luftblasenfrei platziert und in der Dunkelkammer entwickelt. Hierzu wurde ein lichtgeschützter Röntgenfilm exponiert, der für verschiedene Zeitspannen durch die emittierten Photonen geschwärzt wurde. Danach wurde der Röntgenfilm in dafür vorgesehene Rahmen eingespannt, entwickelt, fixiert und gespült. Abschließend wurde die Menge und Größe der auf dem Film abgebildeten Proteine analysiert.

4 Ergebnisse

4.1 Der Fusions-Inhibitionsmechanismus des mAK K41 gegen CD9 bei der CDV-Infektion

4.1.1 mAK K41 gegen CD9 verursacht Veränderungen in der Membranstruktur von Kulturzellen

Tetraspanine, wie das CD9-Molekül, interagieren in der Plasmamembran mit anderen Tetraspaninen oder Rezeptoren und bilden somit ein sogenanntes Tetraspaninnetzwerk oder Tetraspanin angereicherte Mikrodomänen (TEMs). Es ist bekannt, dass CD9 die Formbarkeit und Beweglichkeit zellulärer Membranen und Zellen reguliert sowie verschiedene Virus-induzierte Prozesse an Membranen moduliert. Anfang 1997 konnte gezeigt werden, dass mAK K41 einen Hemmeffekt auf die CDV-Infektion aufweist, in dem er die CDV-induzierte Zell-Zellfusion hemmt (Löffler et al., 1997). Wenig später konnte geklärt werden, dass die Fusionsinhibition ebenso in Transfektions-Assays unter Verwendung von Plasmiden besteht, die das H- und F-Protein des Hundestaupe-Virus exprimieren. Des Weiteren wurde gezeigt, dass die extrazelluläre Domäne des Hämagglutinins des CDV als mAK K41-reguliertes Molekül fungiert und sensitiv für die Wirkung des CD9-Antikörpers ist, diesen aber nicht bindet (Singethan et al., 2006). Diese Daten ließen vermuten, dass strukturelle Veränderungen der Plasmamembran die Aktivität oder das Expressionsmuster der bisher unbekanntenen Rezeptoren von CDV teilweise regulieren könnten. Da mAK K41 die Zell-Zellfusion inhibiert, folglich also die Infektion von Zelle zu Zelle behindert, sollten erste Versuche zeigen, ob es möglich ist, gewisse Strukturveränderungen in Plasmamembranen oder Zellkontakten zu beobachten.

4.1.1.1 Strukturelle Veränderungen nach mAK K41-Inkubation von HUVEC, Vero- und HeLa-Zellen

Um eventuelle strukturelle Veränderungen auf der Zelloberfläche von HUVECs, Vero- und HeLa-Zellen beobachten zu können, wurden diese mit verschiedenen Konzentrationen des mAK K41 für 20 h ÜN bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Um HUVECs für die Versuche verwenden zu können, mussten diese frisch aus der Nabelschnur isoliert und präpariert werden (siehe Kapitel 3.1.3). Die verschiedenen Zelltypen wurden dann mit 5, 10 und 15 µg/ml mAK K41, denselben wirksamen Konzentrationen wie auch schon in den oben erwähnten Transfektions-Assays verwendet, inkubiert. Etwa 20 h später wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und das CD9-Molekül mittels Immunfluoreszenzfärbung mit Alexa 594-markiertem Zweitantikörper gefärbt (siehe Kapitel 3.3.2). Anschließend wurden die Zellen im konfokalen Mikroskop analysiert und fotografiert. Die nicht vorbehandelten Kontrollzellen wurden fixiert, permeabilisiert und anschließend 1 h mit mAK K41 und Alexa 594-gekoppeltem Zweitantikörper gefärbt.

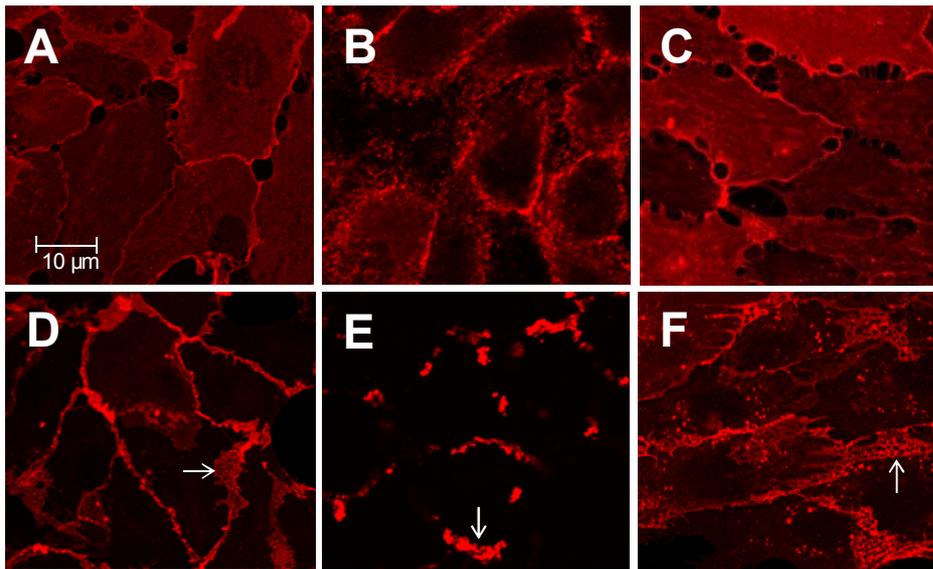


Abbildung 4.1.1.1.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von HUVECs, Vero- und HeLa-Zellen, die mit mAK K41 gefärbt wurden (A, B, C) und mit 15 µg/ml mAK K41 (D, E, F) für 20 h vorinkubiert wurden. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte mit dem primären Antikörper mAK K41 (1 : 100) und Alexa 594-gekoppeltem Zweitantikörper (1 : 200; rot). Die Pfeile in D, E, F zeigen die großen CD9-reichen Cluster an Zell-Zellkontaktbereichen (konfokales Mikroskop; 40fache Vergrößerung).

Wie man in Abbildung 4.1.1.1.1 erkennen kann, liegt das CD9-Molekül bei Vero-Zellen (A) und HUVEC (C) über die gesamte Zelle verteilt. Auch bei HeLa-Zellen (B) konnte eine gleichmäßige Verteilung innerhalb der Zelle beobachtet werden. Allerdings zeigten sich an den Zellrändern clusterförmige, kompaktere CD9-Verteilungen als bei HUVECs und Vero-Zellen, wo das CD9-Molekül speziell auch an den Zellgrenzen lokalisiert war. Alle weiteren Bilder zeigen (D - F), dass das CD9-Molekül mit einer Antikörperkonzentration von 15 µg/ml verstärkt an den Zellgrenzen akkumuliert und dabei verzweigte, netzartige Strukturen entstehen, die durch die Pfeile markiert wurden. Diese großen CD9-haltigen Cluster sind ausschließlich an Stellen zu finden, an denen zwei Zellen miteinander in Kontakt treten. Während sie bei Vero-Zellen und HUVECs wie netzartige Strukturen wirken, sind sie in HeLa-Zellen zu dichten, kompakteren Aggregaten zusammen gelagert. Diese Strukturen erreichten in HeLa-Zellen bis zu 10 µm Länge, während sie auf Vero-Zellen bis zu 20 µm und auf HUVECs bis zu 30 µm lang waren. Um die CD9-Cluster wie in Abbildung 4.1.1.1.1 (D) - (F) aufzulösen, wurden die Signalintensitäten am Mikroskop herabgesetzt, was zur Folge hat, dass nicht zusammengelagerte CD9-Moleküle, wie diejenigen, die sich beispielsweise innerhalb der Zelle befinden, nicht mehr oder nur noch schwach detektierbar sind. Wird das Signal aber wieder verstärkt, ist klar zu erkennen, dass CD9 nicht komplett aus dem Zellinnern verschwindet.

4.1.1.2 Strukturelle Veränderungen nach anti-CD63 und anti-CD81-Inkubation von Vero-Zellen

Nun wurden zwei weitere Tetraspaninmoleküle als Kontrolle gefärbt und inkubiert, um herausfinden zu können, ob es sich bei der beobachteten Umlagerung tatsächlich ausschließlich um spezifische CD9-Strukturen handelte. Daher wurden die Tetraspanine CD63 und CD81 ausgewählt, die ebenfalls wie CD9, zu dem Tetraspaninnetzwerk zählen. Diese wurden im gleichen Versuchsansatz, wie oben beschrieben, auf Vero-Zellen mit und ohne 15 µg/ml anti-CD63 und anti-CD81 AK inkubiert und mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung ihre Verteilung innerhalb der Zellen nach 20 h sichtbar gemacht (siehe Abbildung 4.1.1.2.1).

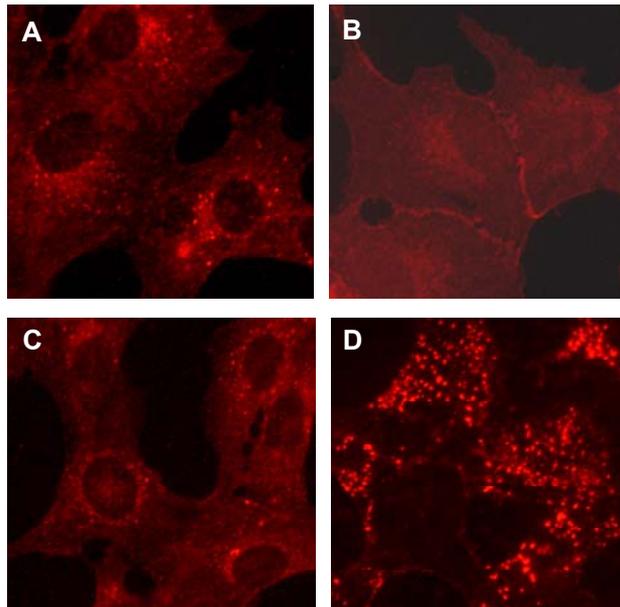


Abbildung 4.1.1.2.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen, die mit anti-CD63 (1 : 100) gefärbt wurden (A) sowie mit 15 µg/ml anti-CD63 für 20 h vorinkubiert (C) und anschließend gefärbt wurden. In (B) sieht man die anti-CD81-Färbung mit Z81.1 (1 : 100) sowie die Färbung nach Inkubation mit 15 µg/ml Z81.1 für 20 h (D); weiterhin wurde ein Alexa 594-gekoppelter Zweitantikörper (1 : 200; rot) verwendet; (konfokales Mikroskop; 40fache Vergrößerung).

Betrachtet man in Abbildung 4.1.1.2.1 (A) und (C) die CD63-Verteilung vor und nach der Inkubation mit 15 µg/ml anti-CD63 Antikörper ist zu erkennen, dass sich die Verteilung innerhalb der Zelle kaum verändert. CD63 liegt immer in kleinen punktförmigen Clustern in der Zelle verteilt vor und ist außerdem diffus über den gesamten Zellkörper verteilt. Im Gegensatz dazu ist das CD81-Molekül diffus über den Zellkörper verteilt und akkumuliert leicht an den Zellgrenzen (B), wie dies auch bei CD9 zu beobachten war (siehe Abbildung 4.1.1.1.1 (A)). Nach der Inkubation mit 15 µg/ml des anti-CD81 Antikörpers verändert sich die CD81-Verteilung. In (D) ist eine starke Clusterbildung aber keine Bildung von Netzstrukturen zu erkennen. Zusätzlich wurde getestet, ob die Verwendung von anti-CD63- bzw. anti-CD81 Antikörpern in einer Konzentration von 15 µg/ml die CD9-Verteilung zu netzartigen Clustern induzieren kann, was sich aber nicht bestätigte (Daten nicht gezeigt).

4.1.1.3 Identifizierung der großen extrazellulären Domäne (LEL) des CD9-Moleküls als mAK K41-bindende Domäne

Um herauszufinden, welche Domäne des CD9-Moleküls von mAK K41 erkannt wird, wurden Plasmide genutzt, die chimäre Tetraspanine aus CD9, CD81 und CD82 exprimierten. Dabei waren die verschiedenen Chimären jeweils aus unterschiedlichen Regionen wie der extrazellulären Domäne (EC) 1 und 2, der Tetraspanine CD9, CD81 und CD82 zusammengesetzt (siehe Abbildung 4.1.1.3.1).

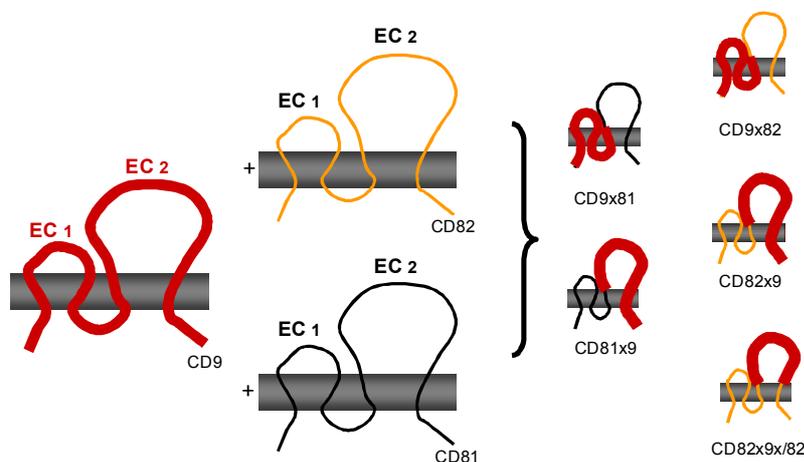


Abbildung 4.1.1.3.1: Chimäre Tetraspanine zusammengesetzt aus Extrazellulärer Schleife (EC) 1 oder 2 aus CD9, CD81 und CD82; zur Verfügung gestellt von Prof. Dr. E. Rubinstein, Hospital Paul Brousse, Paris, Frankreich.

Es wurden CD9-negative CHO-Zellen mit den Plasmiden, die die chimären Tetraspanine enthielten, für 48 h transfiziert, um anschließend mit mAK K41 und einem FITC-gekoppelten Sekundärantikörper für die FACS-Analyse vorbereitet zu werden (siehe Kapitel 3.3.1). Als Negativkontrolle wurde der pCG-Leervektor verwendet (siehe Abbildung 4.1.1.3.2).

Schließlich konnte festgestellt werden, dass mAK K41 spezifisch die große extrazelluläre Schleife (EC 2 oder LEL) des CD9-Moleküls erkennt. Bei allen chimären Tetraspaninen, in denen nur der extrazelluläre Teil von EC 2 (CD82x9x/82) oder die komplette extrazelluläre Domäne EC 2 (CD81x9; CD82x9) beteiligt waren, konnten diese nach 48 h Transfektion durch mAK K41 erkannt werden (Abbildung 4.1.1.3.2). Hingegen konnten mit Hilfe von mAK K41 nur spezifisch das CD9-Molekül, und nicht die anderen Tetraspanine wie CD81 oder CD82, erkannt werden. Die extrazelluläre Schleife 1 (EC 1) wurde nicht von mAK K41 erkannt, was bei Verwendung von pCD9x81 und pCD9x82 zu sehen war, die in der Erkennung des Moleküls der Negativkontrolle gleich zu setzen waren.

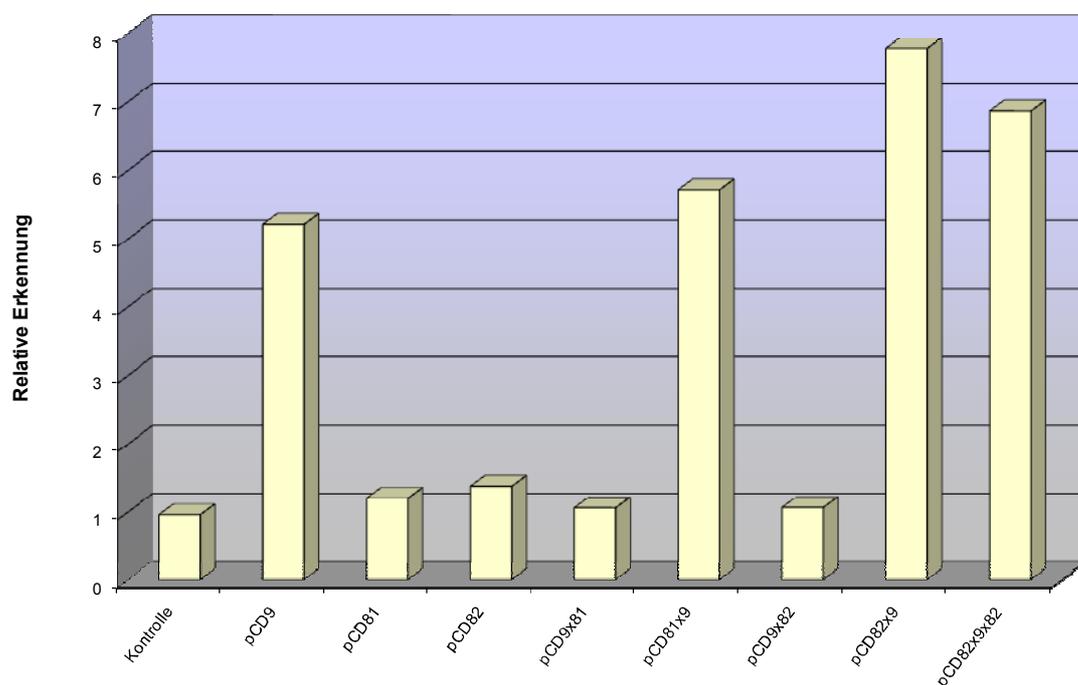


Abbildung 4.1.1.3.2: FACS-Analyse von Vero-Zellen, die mit den Expressions-Chimären aus CD9, CD81 und CD82 sowie mit einem Leervektor als Negativkontrolle transfiziert wurden. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgte nach 48 h mit mAK K41 (1 : 100) und FITC-gekoppeltem Sekundärantikörper (1 : 100); in der FACS-Analyse wurde die Intensität der mit dem pCG-Leervektor transfizierten CHO-Zellen gleich 1 gesetzt und die relative Fluoreszenzintensität der verschiedenen Ansätze im Vergleich zur Kontrolle angepasst. Die Auswertung zeigt einen Durchschnittswert aus drei unabhängigen Experimenten.

4.1.1.4 Nur bivalente mAK K41 induzieren CD9-Cluster an Zellgrenzen und hemmen die CDV-induzierte Zell-Zellfusion

Nachdem gezeigt werden konnte, dass durch den bivalenten mAK K41 CD9-beinhaltende Netzstrukturen induziert werden können, sollte untersucht werden, ob dies mit Fab-Fragmenten des Antikörpers (IgG1κ) ebenso möglich sein würde. Hierzu wurde der Antikörper mit Hilfe des ImmunoPure® Fab Preparation Kits in seine Bestandteile aus Fab- und Fc-Fragmenten zergliedert (siehe Kapitel 3.5.2). Anschließend konnten die Fab-Fragmente, die CD9, ähnlich wie der bivalente mAK K41, auf der Oberfläche erkannten, in FACS-Analysen (siehe Abbildung 4.1.1.4.1) und Immunfluoreszenzfärbungen verwendet werden.

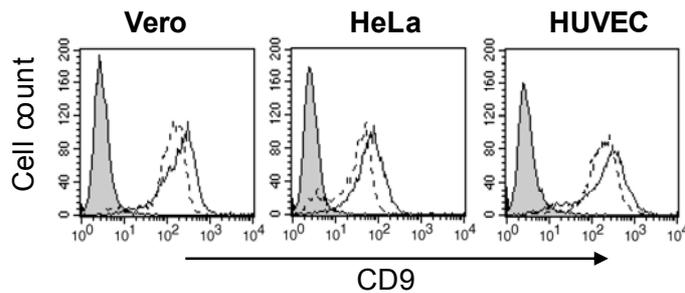


Abbildung 4.1.1.4.1: FACS-Analyse von HUVECs, Vero- und HeLa-Zellen, die mit dem kompletten mAK K41 (schwarze Linie; 5 µg/ml), mit dem K41 Fab-Fragment (gestrichelte Linie; 2 µg/ml), mit der Isotyp-Kontrolle (grau hinterlegte Linie; 5 µg/ml) und mit FITC-konjugierten Sekundärantikörpern (1 : 100) gefärbt wurden.

Bei einer Verwendung der Fab-Fragmente in Immunfluoreszenzfärbungen in Konzentrationen von 2 - 5 µg/ml, was einer Molarität der Epitop-Bindungsstelle von 5 - 15 µg/ml des kompletten, bivalenten mAK K41 entspricht, konnten keine CD9-Cluster induziert werden. Als zusätzliche Kontrolle wurden Vero-Zellen mit 10 µg/ml der Fab-Fragmente für 20 h inkubiert und es wurden keine netzartigen CD9-Strukturen induziert. Des Weiteren wurden die Fab-Fragmente mit Sekundärantikörpern (Ziege-anti-Maus-Ig-F(ab')₂-Fragment-RPE) quervernetzt und es konnten wiederum keine Netzstrukturen induziert werden (Daten nicht gezeigt). Die Verteilung des CD9-Moleküls war in allen Fällen so zu beobachten, wie dies in Abbildung 4.1.1.1.1 (A) für Vero-Zellen gezeigt wurde.

Ferner wurde die CDV-induzierte Synzytienbildung zur Untersuchung der Funktionalität der Fab-Fragmente verwendet. Hierzu wurden Vero-Zellen mit CDV-H- und -F-exprimierenden pCG-Vektoren für 20 h bei 37 °C transfiziert und zusätzlich mit verschiedenen Antikörperzugaben simultan inkubiert (siehe Kapitel 3.2.3). Dabei war zu beobachten, dass Fab-Fragmente alleine und in Kombination mit quervernetzenden Antikörpern (Abbildung 4.1.1.4.2 (B), (D)) die Zell-Zellfusion in Vero-Zellen, im Gegensatz zu transfizierten Vero-Zellen, die mit dem kompletten mAK K41 behandelt wurden (C), nicht inhibieren konnten. In (A) werden als Vergleich transfizierte aber nicht mit mAK K41 behandelte Zellen gezeigt.

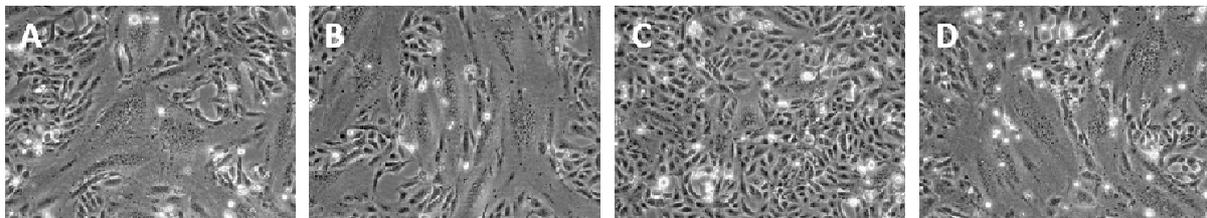


Abbildung 4.1.1.4.2: Lichtmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen, die mit pCG-CDV-H und pCG-CDV-F transfiziert wurden. Transfizierte Vero-Zellen ohne AK (A), nach gleichzeitiger Inkubation mit dem K41 Fab-Fragment (5 µg/ml) (B), mit dem kompletten mAK K41 (15 µg/ml) (C) und mit dem K41 Fab-Fragment (5 µg/ml), das mit Sekundärantikörpern (10 µg/ml) quervernetzt wurde (D); (Lichtmikroskop; 20fache Vergrößerung).

Betrachtet man Abbildung 4.1.1.4.2 ist klar zu erkennen, dass die Fab-Fragmente die Synzytienbildung nicht hemmen können. Selbst unter Verwendung quervernetzender Antikörper (D) konnte keine Hemmung der Zell-Zellfusion wie in (B) mit komplettem mAK K41 erreicht werden. Die in den entstandenen Synzytien vorhandenen Nuklei wurden anschließend in fünf verschiedenen Bereichen am Lichtmikroskop gezählt und der Durchschnittswert gebildet. Zusätzlich wurden drei unabhängige Versuchsansätze wiederholt und die Durchschnittsdaten ins Verhältnis zum Kontrollwert gesetzt, der 100 % entsprach und durch unbehandelte, transfizierte Vero-Zellen mit starker Synzytienbildung vertreten war. Während das Fab-Fragment in verschiedenen Ansätzen mit jeweils 5 µg/ml eingesetzt wurde, sollten die quervernetzenden Zweitantikörper in verschiedenen Konzentrationen von jeweils 2, 5 und 10 µg/ml eingesetzt werden. Als weitere Kontrolle dienen transfizierte Zellen, die zusätzlich nur mit dem verwendeten Sekundärantikörper in einer Konzentration von 10 µg/ml behandelt wurden.

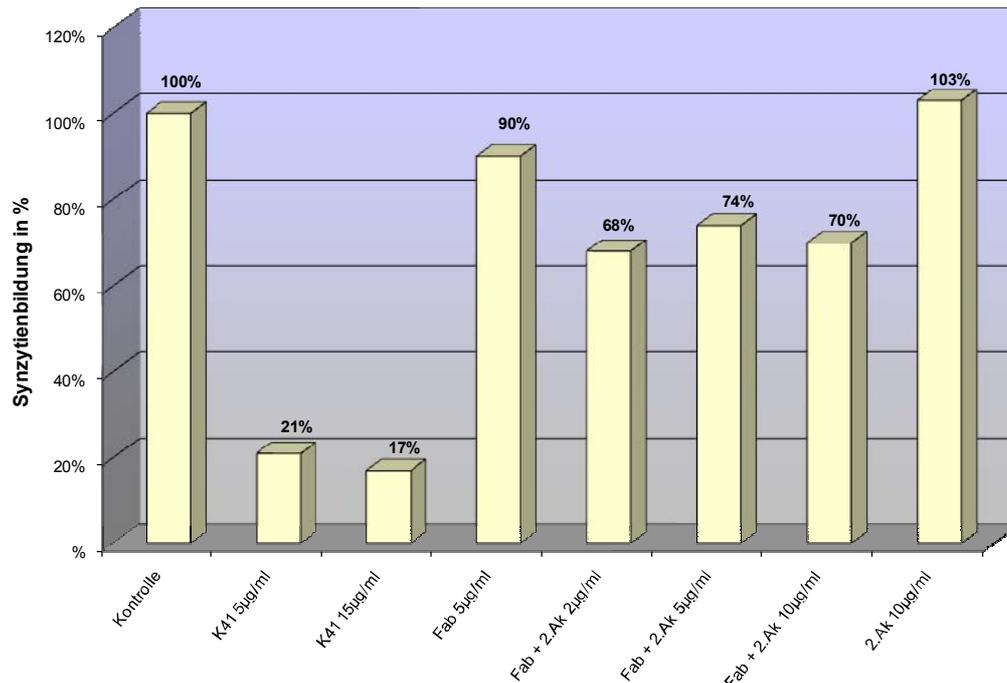


Abbildung 4.1.1.4.3: Quantifizierung der CDV-induzierten Synzytienbildung in Vero-Zellen, die mit pCG-CDV-H und pCG-CDV-F ÜN transfiziert und gleichzeitig mit verschiedenen Antikörperkonzentrationen inkubiert wurden; Kontrolle: transfizierte Zellen ohne Antikörper. Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten; Daten wurden ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt, die 100 % entspricht. Reihe 1: Kontrolle; Reihe 2 und 3: 5 und 15 µg/ml mAK K41; Reihe 4: 5 µg/ml K41 Fab-Fragment; Reihe 5 - 7: 5 µg/ml Fab-Fragment inkubiert für 1 h plus 2, 5 und 10 µg/ml quervernetzender Sekundärantikörper Ziege-anti-Maus-Ig-F(ab')₂-Fragment-RP.

Abschließend kann man feststellen, dass Fab-Fragmente keine CD9-Aggregation induzieren noch die Synzytienbildung von mit pCG-CDV-H und -F transfizierten Vero-Zellen im Gegensatz zum kompletten, bivalenten mAK K41 hemmen können (siehe Abbildung 4.1.1.4.3). Selbst in Kombination mit quervernetzenden Sekundärantikörpern konnte keine Hemmung der (Reihe 5 - 7) Zell-Zellfusion beobachtet werden.

Somit konnte ausschließlich mit dem kompletten mAK K41 die Bildung der CD9-Netzstrukturen induziert und ebenfalls die CDV-induzierte Zell-Zellfusion gehemmt werden.

4.1.1.5 CD9-Antikörper Klone zeigen unterschiedliche Hemmung der CDV-induzierten Synzytienbildung sowie CD9-Clustering

In weiteren Untersuchungen wurde beispielsweise bei Färbungen, bei denen Antikörper gleicher Wirtsspezies verwendet werden mussten, der CD9-AK gegen direkt markierte Antikörper ausgetauscht. Außerdem wurden verschiedene Klone von CD9-Antikörpern verschiedener Firmen durchgetestet. Dabei musste festgestellt werden, dass manche Klone, wie CD9-FITC Klon P1/33/2 (Dako) (siehe Abbildung 4.1.1.5.1 (A - B)), CD9-PE Klon ML-13 (Becton Dickinson), Klon ALB-6 (Abcam) und Klon MM2/57 (Abcam) die Bildung von CD9-Netzstrukturen induzieren konnten, während andere Klone, wie Klon MM2/57 (Serotec) und Klon H110 (Santa Cruz; (C - D)) dies nicht vermochten. Alle Klone wurden mit 15 µg/ml eingesetzt, während die nicht funktionierenden in einer Konzentration von bis zu 100 µg/ml untersucht wurden.

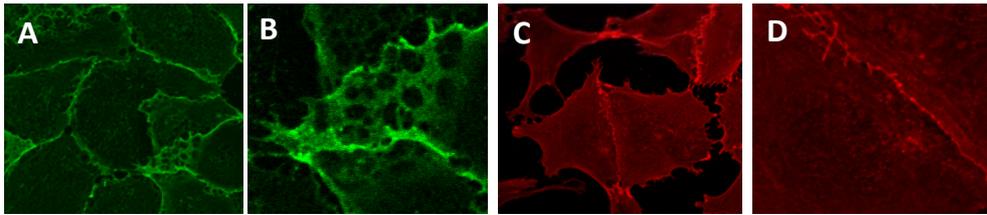


Abbildung 4.1.1.5.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen, die mit 15 µg/ml des FITC-gekoppelten CD9-Antikörperklons P1/33/2 für 20 h vorinkubiert wurden (A - B; grün). (B) zeigt eine Vergrößerung aus (A). Im Vergleich sind mit 15 µg/ml H110-behandelte Vero-Zellen zu sehen (C - D); weiterhin erfolgte die Immunfärbung mit dem Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200; rot) (Konfokales Mikroskop; 40fache Vergrößerung (A, C); 40fache Vergrößerung mit 2facher Zoomansicht (B, D)).

Interessanterweise zeigten diejenigen Klone, die CD9-Cluster an den Zellgrenzen bilden konnten, auch die Fähigkeit, die CDV-induzierte Synzytienbildung zu hemmen (siehe Abbildung 4.1.1.5.1). Dies wurde in Transfektions-Assays getestet, in denen wiederum pCG-CDV-H und -F in Vero-Zellen transfiziert und gleichzeitig 15 µg/ml der unterschiedlichen CD9-Antikörperklone inkubiert wurden. Nach 20 h wurden die Nuklei der Synzytien in 5 verschiedenen Bereichen am Lichtmikroskop gezählt und ein Durchschnittswert gebildet. Insgesamt wurden die Versuche in drei unabhängigen Ansätzen wiederholt und die Durchschnittswerte im Verhältnis zum Kontrollwert umgerechnet. Die Kontrolldaten wurden gleich 100 % gesetzt und waren durch transfizierte Vero-Zellen ohne Antikörperbehandlung vertreten.

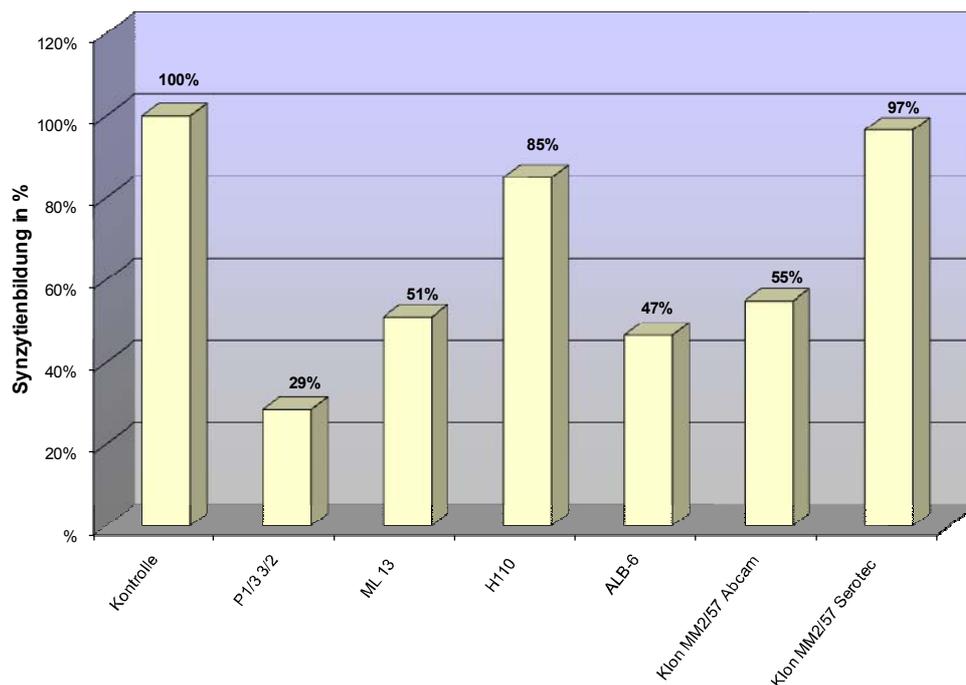


Abbildung 4.1.1.5.1: Quantifizierung der CDV-induzierten Synzytienbildung in Vero-Zellen, die mit pCG-CDV-H und pCG-CDV-F ÜN transfiziert und gleichzeitig mit 15 µg/ml verschiedener Antikörperklone inkubiert wurden. Kontrolle: transfizierte Zellen ohne Antikörper. Durchschnittswerte aus drei unabhängigen Experimenten; Daten wurden ins Verhältnis zur Kontrolle gesetzt, die 100 % entspricht.

Abschließend ist zu bemerken, dass nur bestimmte Klone der Antikörper gegen CD9 die Fähigkeit aufweisen, die Induktion der CD9-Cluster bzw. der netzartigen Strukturbildung auszulösen. Zudem konnten Antikörper mit der Fähigkeit CD9-Cluster zu bilden auch die in Transfektions-Assays getestete Zell-Zellfusion inhibieren, während beispielsweise der CD9-Antikörper H110 oder MM2/57 der Firma Serotec weder die Synzytienbildung noch die Ausbildung von Netzstrukturen bewirken konnte. Dagegen zeigte Klon MM2/57 der Firma Abcam eine Hemmung der Synzytien sowie die Induktion von CD9-Netzstrukturen.

4.1.1.6 Konfokale mikroskopische Analyse zeigt Details der CD9-Cluster

Um den genauen Aufbau der CD9-Aggregate an den Zellgrenzen weiter zu untersuchen, wurden diese für die Analyse im konfokalen Mikroskop auf Vero-Zellen durch eine Inkubation des mAK K41 bei 37 °C für 20 h induziert. Anschließend konnten diese in einer Immunfluoreszenzfärbung mit K41 (1 : 100) unter Verwendung eines Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörpers (1 : 100) gefärbt und analysiert werden (siehe Abbildung 4.1.1.6.1). Dabei bestätigte sich, dass die CD9-Cluster exklusiv an den Zellkontaktstellen auftreten und nicht an Stellen zu finden sind, die mit freien Oberflächen oder der Zellkulturschale in Kontakt standen.

Durch nähere Betrachtung konnte mit Hilfe eines Z-Stapels eines ausgewählten Bildausschnitts, ein Teilbereich dieser netzartigen CD9-Cluster der Zellgrenzen dreidimensional abgebildet werden (Abbildung 4.1.1.6.1 (C)). Dabei konnte gezeigt werden, dass die netzähnlichen Strukturen aus globulären, CD9-positiven Ausstülpungen bestehen, die in einem engen Geflecht miteinander assoziiert sind (B, C). Dies wurde besonders auch durch die Ansicht der Z-Stapel in X- und Y-Richtung bestätigt, da sich hier säulenartige Formen abzeichneten, die sich eindeutig durch die gesamte Struktur hindurch fortsetzten, während sich dazwischen hohle Zwischenbereiche bilden.

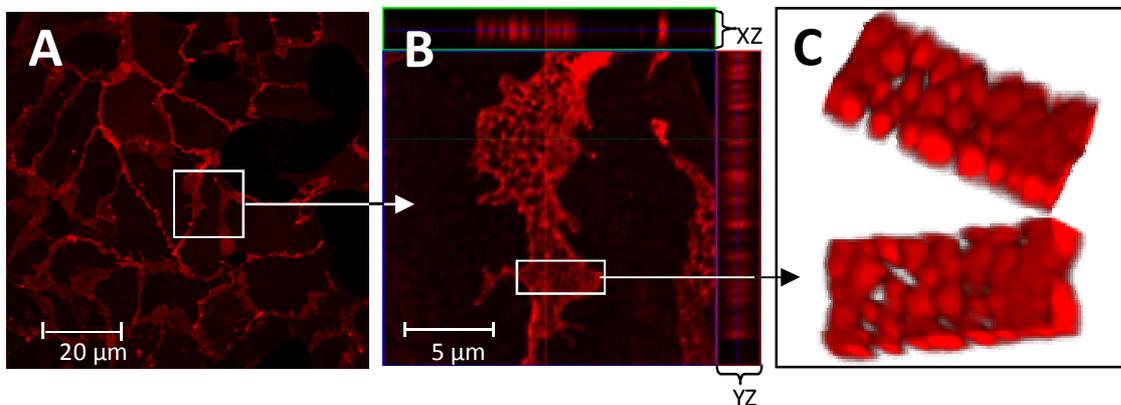


Abbildung 4.1.1.6.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen, die mit 15 µg/ml mAK K41 20 h bei 37 °C vorinkubiert wurden (A). Vergrößerte Aufnahme einer Zellgrenze (B), von der der ausgewählte Bereich im Kästchen durch die Ebene hindurch als Z-Stapel mit 20 Aufnahmen fotografiert und verschiedene Ansichten eines 3D-Bildes angefertigt (C) wurden. Die Immunfärbung erfolgte mit dem primären Antikörper mAK K41 (1 : 100) und dem Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) (konfokales Mikroskop; 20fache Vergrößerung (A); 40fache Vergrößerung mit 2facher Zoomansicht (B) eines ausgewählten Bereichs; (C) 3D-Rekonstruktion eines Z-Stapels).

4.1.1.6.1 CD9-Cluster und ihre Assoziation mit F-Aktin

Weitere Färbungen mit einem zusätzlichen Antikörper gegen F-Aktin zeigten, dass diese CD9-Ausstülpungen in engem Kontakt mit den Aktinfilamenten stehen, diese sich aber nicht innerhalb der globulären, CD9-positiven Struktur befanden (Abbildung 4.1.1.6.1.1). Die mit mAK K41 inkubierten Zellen wurden dabei für die Färbung vorbereitet wie in Kapitel 3.3.2 beschrieben, allerdings wurde der CD9-AK für nur 2 h auf den Zellen vorinkubiert. In Vorversuchen hatte sich gezeigt, dass diese Zeitspanne ausreichte, um die netzartigen CD9-Aggregate zu induzieren. Als weiterer Antikörper wurde Phallotoxin gegen F-Aktin in einer Verdünnung von 1 : 50 eingesetzt. Zusätzlich konnten auch HUVECs und HeLa-Zellen auf diese Weise untersucht und die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen von Vero-Zellen bestätigt werden.

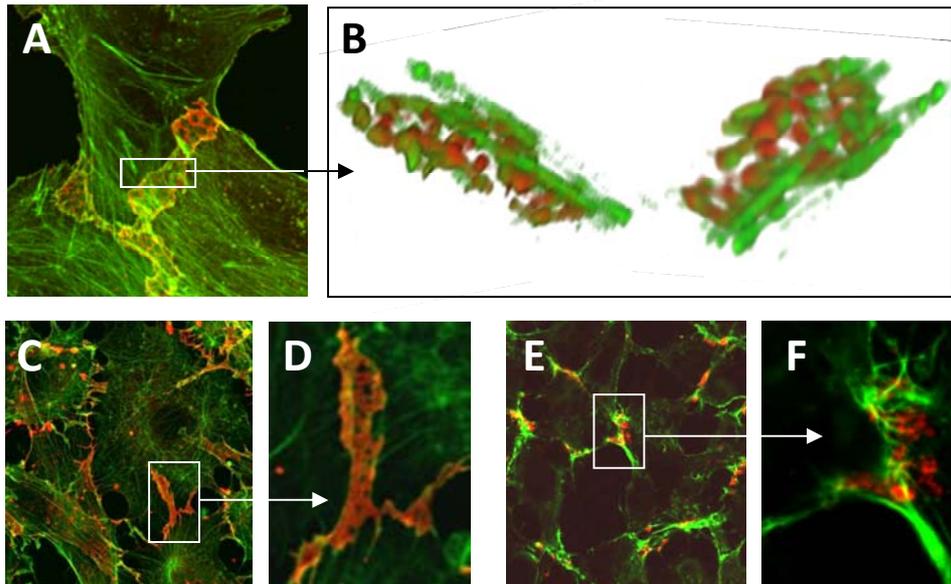


Abbildung 4.1.1.6.1.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen (A, B), HUVECs (C, D) und HeLa-Zellen (E, F), die mit 15 $\mu\text{g/ml}$ mAK K41 2 h bei 37 °C inkubiert und mit Alexa 594-gekoppeltem Zweitantikörper (1 : 200; rot) sowie Phallotoxin gegen F-Aktin (1 : 50; grün) gefärbt wurden; (konfokales Mikroskop; (A, C, E) 40fache Vergrößerung mit 2facher und 3facher (D - F) Zoomansicht eines ausgewählten Bereichs; (B) 3D-Rekonstruktion eines Z-Stapels des ausgewählten Bereichs im Kästchen aus (A)).

Durch den angefertigten Z-Stapel des Bildausschnitts, des im Kasten markierten Bereichs von Abbildung 4.1.1.6.1.1 (A), konnte eine dreidimensionale Rekonstruktion der CD9-Strukturen, die von F-Aktin Fäden durchzogen werden, analysiert werden. So war F-Aktin zwischen den netzartigen Säulenstrukturen lokalisiert und stand mit diesen in engem Kontakt. Das Gleiche konnte in (C, D) für die HUVECs beobachtet werden. In (E, F) werden gefärbte HeLa-Zellen gezeigt, für die bereits eine kompaktere, dichtere CD9-Struktur beschrieben wurde (siehe Kapitel 4.1.1.1). Durch die Auflösung des konfokalen Mikroskops ist zu sehen, dass die Strukturen dennoch aus kleinen, globulären CD9-Ausstülpungen bestehen, so wie dies auch für Vero- Zellen und HUVECs beschrieben wurde. Durch die relativ kleine Größe der HeLa-Zellen selbst und deren Strukturen im Verhältnis zu den anderen Zelltypen, scheinen die CD9-Cluster auf den ersten Blick eher nicht netzartig, im Gegensatz zu Vero-Zellen und HUVECs. Durch diese nähere Betrachtung konnte jedoch festgestellt werden, dass sie unter hoher Auflösung ebenso aus einem Geflecht von CD9-Ausstülpungen, die mit F-Aktin durchsetzt sind, bestehen.

4.1.1.6.2 Zerstörung des Zytoskeletts: Auflösung der netzartigen CD9-Strukturen

Nachdem der starke Kontakt zwischen F-Aktin und den CD9-Strukturen beobachtet worden war, stellte sich die Frage, ob das Zytoskelett der Zelle eventuell eine wichtige unterstützende Funktion bei der Erhaltung der netzartigen Strukturen hat. Daher wurde in mehreren Versuchen untersucht, ob durch die Zerstörung des Zytoskeletts unter Verwendung von Latrunculin B die Bildung der CD9-Strukturen erhalten bleiben kann. Dazu wurden Vero-Zellen mit 15 $\mu\text{g/ml}$ mAK K41 inkubiert und mit sowie ohne 60 mM Latrunculin B für 2 h behandelt. Danach wurden sie in einer Immunfluoreszenz mit mAK K41 (1 : 100) und Alexa 594-gekoppeltem Zweitantikörper (1 : 200) sowie Phallotoxin (1 : 50) gefärbt und am konfokalen Mikroskop analysiert (siehe Abbildung 4.1.1.6.2.1).

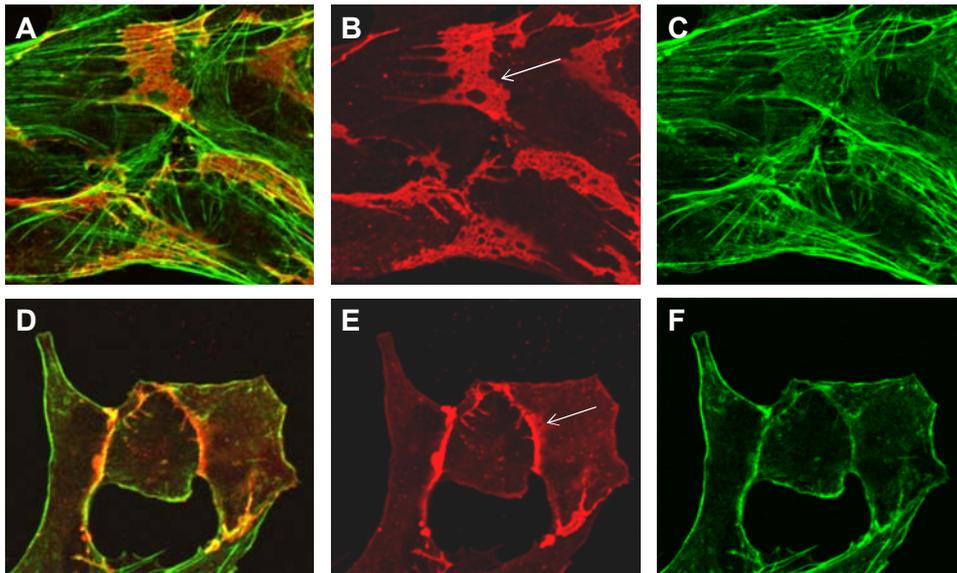


Abbildung 4.1.1.6.2.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen mit 15 µg/ml mAK K41 (A - C), oder gleichzeitig mit Latrunculin B (60 mM) und 15 µg/ml mAK K41 (D - F) für 2 h. Die Immunfärbung wurde mit Phallotoxin (1 : 50; grün) und mAK K41 (1 : 100) sowie Alexa 594-gekoppeltem Zweitantikörper (1 : 200; rot) durchgeführt; (Konfokales Mikroskop 40fache Vergrößerung mit 2facher Zoomansicht).

Vero-Zellen, die ihre Aktinfibrillen ausbilden konnten (A - C), bildeten weiterhin CD9 netzartige Strukturen (Pfeil in (B)), die von filamentösen Aktinfäden durchzogen waren. Hingegen konnte bei mit Latrunculin B behandelten Zellen festgestellt werden, dass durch die Unterbindung der Fibrillenbildung auch keine CD9-Strukturen mit netzähnlichem Aufbau an den Zellkontakten zu sehen waren (Pfeil in (E)). Daher korrelierte die Zerstörung des Zytoskeletts mit dem Ausbleiben der CD9-Strukturbildung.

Abschließend ist zu sagen, dass CD9-Netzstrukturen in engem Kontakt mit dem Aktinzytoskelett stehen, da es eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung der Strukturen zu spielen scheint, was durch die Zerstörung des Zytoskeletts durch Latrunculin B und dem darauf folgenden Ausbleiben der CD9-Cluster an den Zellgrenzen bestätigt werden konnte.

4.1.1.7 Hochauflösende Aufnahmen der CD9-Cluster zeigen Mikrovilli-ähnliche Ausstülpungen im Elektronenmikroskop

Nachdem die netzartigen Säulenstrukturen in dreidimensionalen Aufnahmen im konfokalen Mikroskop analysiert worden waren, sollten diese in weiteren Untersuchungen im Elektronenmikroskop auf Vero-Zellen, die sich auf Objektträger befanden, analysiert werden. Durch eine Inkubation des mAK K41 bei 37 °C für 2 h, 6 h und 20 h wurden diese induziert. Anschließend konnten die Präparate ÜN fixiert und am nächsten Tag mit PBS gewaschen werden. In mehreren Teilschritten wurden die Versuchsansätze dann entwässert und letztlich für die Analyse am Rasterelektronenmikroskop (ERM) vorbereitet (siehe Kapitel 3.3.4). Als Negativkontrolle wurden 15 µg/ml H110, ein Antikörper, dessen Inaktivität auch schon in Kapitel 4.1.1.5 beschrieben wurde, verwendet.

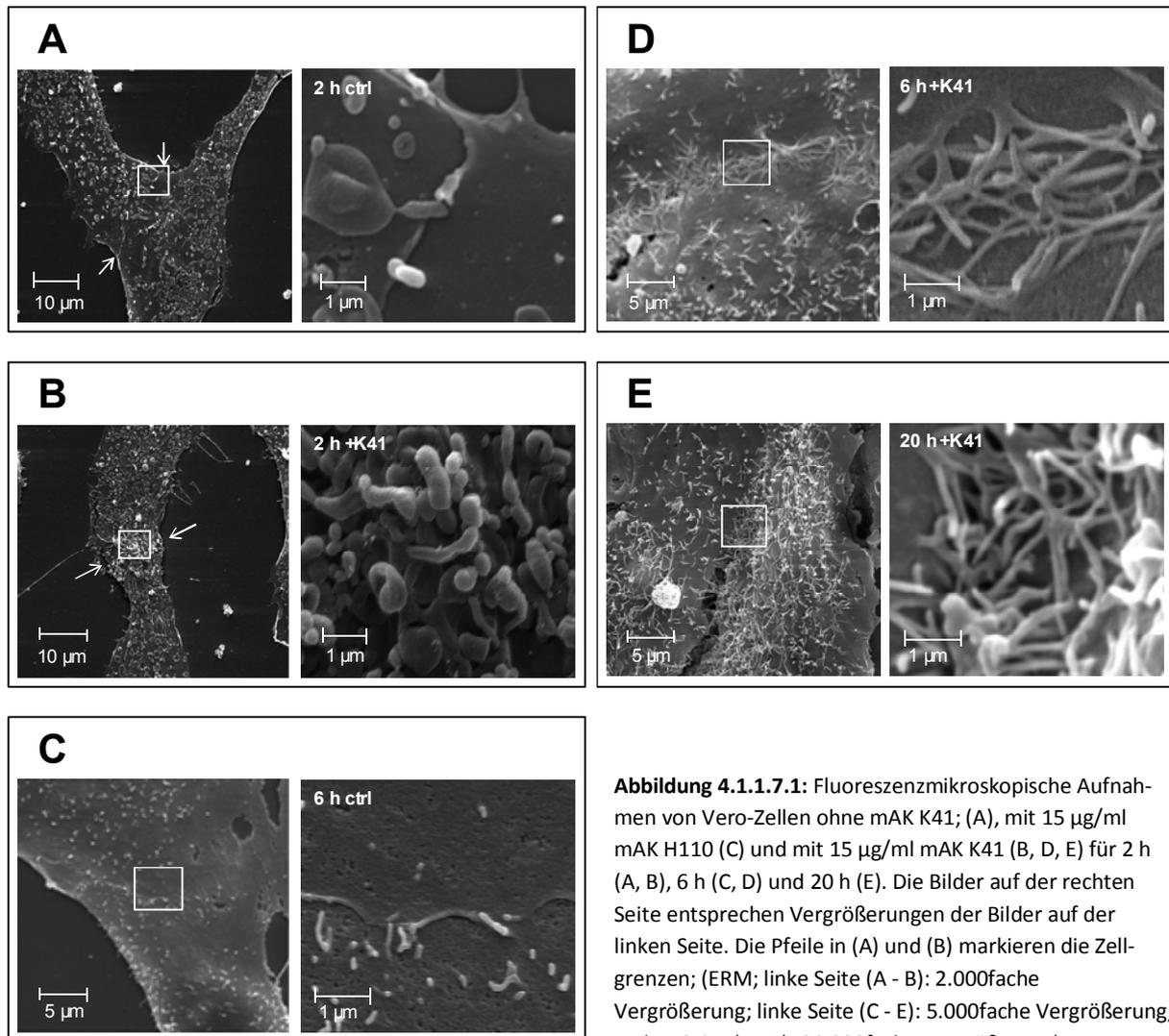


Abbildung 4.1.1.7.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen ohne mAK K41; (A), mit 15 µg/ml mAK H110 (C) und mit 15 µg/ml mAK K41 (B, D, E) für 2 h (A, B), 6 h (C, D) und 20 h (E). Die Bilder auf der rechten Seite entsprechen Vergrößerungen der Bilder auf der linken Seite. Die Pfeile in (A) und (B) markieren die Zellgrenzen; (ERM; linke Seite (A - B): 2.000fache Vergrößerung; linke Seite (C - E): 5.000fache Vergrößerung; rechte Seite (A - E): 20.000fache Vergrößerung).

Die Strukturanalyse konnte zeigen, dass zwischen Zellen, die miteinander in Kontakt standen und nicht mit mAK K41 vorinkubiert wurden, überwiegend sehr gleichmäßige und ebene Grenzen mit wenigen Mikrovilli-Strukturen vorhanden waren (siehe Abbildung 4.1.1.7.1 (A)). Wurde der Antikörper H110 mit 15 µg/ml 6 h inkubiert, blieben die Zellgrenzen ebenfalls unverändert glatt und ohne starke Ausstülpungen (C), was die bisherigen Untersuchungen (siehe Kapitel 4.1.1.5) bestätigte. Im Gegensatz dazu konnten nach 2, 6 und 20 h Inkubation mit mAK K41 viele Mikrovilli-ähnliche Membranausstülpungen an den Zellkontaktbereichen detektiert werden (B, D, E). In einem Zeitrahmen von 2 - 20 h wurden diese Mikrovillistrukturen immer länger und dünner, wobei sie schließlich ca. 0,2 - 0,4 µm dick und mehrere µm lang waren. Zusätzlich konnten Mikrovilli-ähnliche Membranausstülpungen bereits nach 2 h beobachtet werden, die sich im Zeitverlauf bis zu 20 h zu Reißverschluss-ähnlichen Strukturen zwischen den in Kontakt stehenden Zellen entwickelten. Dabei werden diese von jeweils beiden Seiten der Zellen ausgebildet (Abbildung 4.1.1.7.1 (D); Vergrößerungsansicht) und erzeugen so ein Geflecht aus CD9-haltigen Ausstülpungen.

4.1.2 Umlagerung der CD9-Moleküle nach mAK K41-Inkubation

Nachdem die starke Akkumulation von CD9-Molekülen an den Zellgrenzen beobachtet worden war, sollte geklärt werden, ob die entstandenen CD9-Aggregate aus umgelagerten CD9-Molekülen bestehen oder ob größere Mengen an CD9-Molekülen in den mit mAK K41 vorinkubierten Zellen vorhanden waren. Dazu wurde als Quantifizierungsmethode die Western-Blot-Analyse gewählt, in der zuerst ein Überblick über den Zustand der CD9-Mengen in unbehandelten HUVECs, Vero- und HeLa-Zellen gegeben werden sollte. Zusätzlich wurden diese Zelltypen dann 2, 6 und 20 h mit mAK K41 inkubiert und ebenso wie die unbehandelten Zellen für die Western-Blot Analyse lysiert und vorbereitet (siehe Kapitel 3.5.6). Auf einem 14 %igen Polyacrylamidgel wurden die Proben unter nichtreduzierenden Bedingungen getrennt und auf eine Nitrocellulose übertragen. Hier wurden die Banden dann mit mAK K41 (1 : 100) und einem HRP-konjugierten Zweitantikörper (1 : 5.000) mit Hilfe des ECL-Systems (Enhanced Chemiluminescence) sichtbar gemacht (siehe Abbildung 4.1.2.1). Als Ladekontrolle wurde der Moesin-Antikörper 38/87 in einer Verdünnung von 1 : 300 eingesetzt.

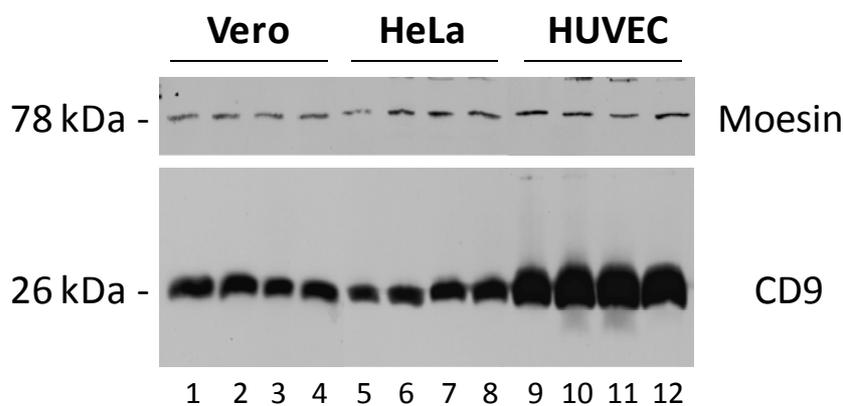


Abbildung 4.1.2.1: Western-Blot-Analyse der Lysate von HUVECs, Vero- und HeLa-Zellen nach 0, 2, 6 und 20 h (jeweils Spur 1 - 4, 5 - 8, 9 - 12) nach mAK K41-Inkubation auf einem 14 %igen Polyacrylamidgel unter nicht reduzierenden Bedingungen aufgetragen. Nach dem Blotting auf Nitrocellulose konnten die CD9 - Banden mit mAK K41 (1 : 100) und HRP-konjugiertem Zweitantikörper (1 : 5.000) sichtbar gemacht werden. Die Moesin-Bande wurde mit 38/87 (1 : 300) detektiert und diente als Ladekontrolle für die Menge der aufgetragenen Zellysate. Spur 1 - 12: 40 µg Gesamtprotein/Tasche.

Im Vergleich zu den unbehandelten Zellen, konnte festgestellt werden, dass es keinen signifikanten Unterschied bzw. Anstieg der gesamten CD9-Moleküle nach mAK K41-Inkubation gab. Somit konnte gezeigt werden, dass das CD9, das auf der Zelloberfläche oder in intrazellulären Lagern vorhanden ist, sich sehr schnell durch die AK-Induktion an die Zell-Zellkontakte verlagert und offensichtlich kein neusynthetisierte CD9-Moleküle nach AK-Inkubation dazu kommen. Somit induziert mAK K41 wohl eine Umlagerung der CD9-Moleküle.

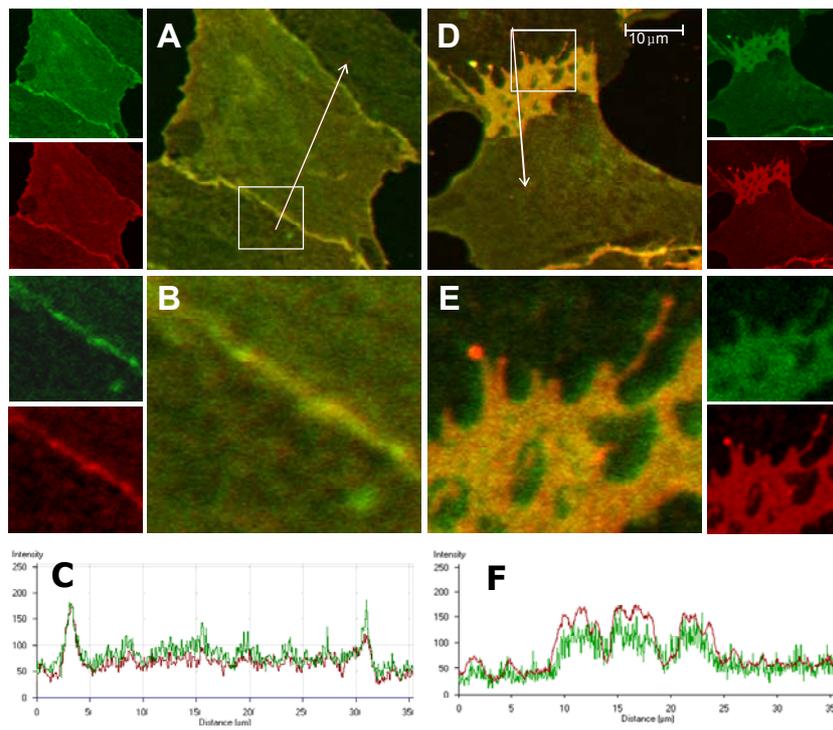
4.1.3 Untersuchung der Kontakte von CD9 mit anderen Molekülen

Um herauszufinden, ob andere Moleküle an der Bildung der CD9-Aggregate beteiligt sein könnten bzw. ob bestimmte Signalwege bei der Induktion dieser Strukturen eine Rolle spielen, wurden verschiedene Experimente angesetzt. Zum einen sollten eventuell bestehende Kontakte zwischen den CD9-Molekülen der Netzstrukturen und anderen Molekülen untersucht werden, indem Ewi-F oder β 1-Integrin in den Vero-Zellen nach mAK K41-Inkubation gefärbt wurden. Dabei fiel die Auswahl auf Ewi-F, da es ein Protein ist, welches das Tetraspaninnetzwerk mit dem Zytoskelett mit Hilfe seiner direkten Assoziation mit ERM-Proteinen (Ezrin, Radixin, Moesin), die beispielsweise in Mikrospeikes auf adhären Zellen lokalisiert sind, verknüpft (Sala-Váldez et al., 2006). Ezrin, Moesin und Radixin gehören dabei zur Familie der aktinbindenden Moleküle und haben die Funktion eines Vermittlers zwischen dem Aktin-Zytoskelett und der Plasmamembran.

Integrine hingegen vermitteln die Zelladhäsion bzw. die Signaltransduktion, wobei die Überexpression von β 1-Integrin beispielsweise die Rac-Aktivität und die Ausbildung von Lammellipodien induziert. So regulieren Integrine verschiedenartig die Aktivität der Familie der Rho-GTPasen (Rho, Rac, Cdc42). Diese sind ebenfalls wichtige Regulatoren der Signaltransduktion, indem sie Signale ausgehend von den Rezeptoren zu den Effektoren weiterleiten und so verschiedenste Zellfunktionen beeinflussen. Rho-GTPasen regulieren viele zelluläre Vorgänge, wie die Organisation und den Umbau des Aktinzytoskeletts, Zelladhäsion, Endozytose und den Vesikeltransport.

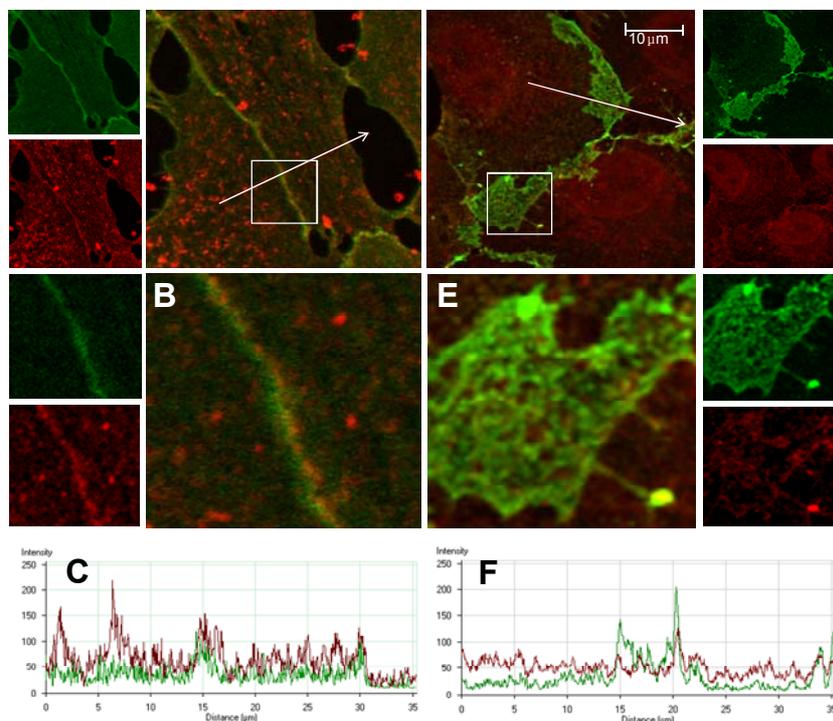
4.1.3.1 Untersuchung der möglichen Kolo-kalisierung von Ewi-F bzw. β 1-Integrin und CD9

Da untersucht werden sollte, ob Ewi-F bzw. β 1-Integrin mit CD9-Molekülen in unbehandelten und mit mAK K41 behandelten Zellen in Kontakt stehen, wurden Vero-Zellen bei 37 °C mit 15 μ g/ml mAK K41 inkubiert und anschließend mit einem Sekundärantikörper Alexa-594-F(ab')₂ Fragment-IgG gefärbt und abgesättigt (1 : 20). Die weitere Färbung erfolgte nach Anleitung des Protokolls „Blockieren und Doppel-Labeling von primären Antikörpern derselben Wirtsspezies“ von Jackson ImmunoResearch/Dianova. Demnach wurde der Ewi-F Antikörper mit einer 1 : 100 Verdünnung inkubiert, um anschließend mit einem Fc γ -spezifischen Fc-CyTM²-konjugierten Zweitantikörper (1 : 50) gefärbt zu werden. In den unbehandelten Vero-Zellen wurde ebenfalls eine CD9- und Ewi-F-Färbung nach dem Protokoll von Dianova vorgenommen. In Abbildung 4.1.3.1.1 ist die Ewi-F-Verteilung in grün und die CD9-Verteilung in rot zu sehen. Ewi-F liegt genau wie CD9 diffus über die Zelle verteilt und akkumuliert ebenfalls an den Zellgrenzen. An der Überlagerung in (A), bestehend aus den zwei seitlichen Einzelbildern, ist zu erkennen, dass Ewi-F in unbehandelten Vero-Zellen perfekt mit CD9 kolo-kalisiert. Ewi-F-Moleküle befinden sich aber nicht ausschließlich in gemeinsamem Kontakt mit CD9-Molekülen, was in den grünen Bereichen der Vergrößerung eines Ausschnittes von (A) in Abbildung 4.1.3.1.1 (B) zu sehen ist. Zusätzlich ist im Profil der Fluoreszenzintensitäten (C) zu erkennen, dass das Ewi-F-Molekül sehr oft aber nicht ausschließlich mit CD9 kolo-kalisiert. Wurden die Vero-Zellen mit 15 μ g/ml mAK K41 vorinkubiert (D, E), konnte man beobachten, dass die Ewi-F-Moleküle ebenfalls stark mit den CD9-Molekülen innerhalb der netzartigen Cluster kolo-kalisiert. Diese Überlagerung konnte auch in einem Profil der Fluoreszenzintensitäten entlang des Pfeils in (D) in Abbildung 4.1.3.1.1 (F) sichtbar gemacht werden, wo die Kolo-kalisierung der beiden Moleküle deutlich wird. Dabei sind (B, E) jeweils die vergrößerten Ausschnitte aus (A, D).

**Abbildung 4.1.3.1.1:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen und deren CD9- bzw. Ewi-F-Expression vor (A, B, C) und nach (D, E, F) der Inkubation mit 15 µg/ml AK K41. Die Immunfärbung wurde mit Hilfe des mAK K41 (1 : 100) und des Zweitantikörper Alexa-594-F(ab')₂ Fragment (1 : 10; rot) durchgeführt. Weiterhin wurden der Ewi-F Antikörper (1 : 100) und der Zweitantikörper Fc_γ-spezifischen Fc-CyTM₂-konjugiert (1 : 50; grün) verwendet; Profile der Fluoreszenzintensitäten der grünen und roten Fluoreszenz entlang der Pfeile sind in (C) und (F) zu sehen; (Konfokales Mikroskop 40fache Vergrößerung (A, D) mit 3facher Zoomansicht (B, E)).

Die Färbung mit β 1-Integrin erfolgte hingegen nach dem allgemeinen Protokoll für Immunfluoreszenzfärbungen (siehe Kapitel 3.3.2). Dabei wurden wiederum unbehandelte und mit 15 µg/ml mAK K41 bei 37 °C inkubierte Vero-Zellen mit mAK K41 (1 : 100) und Alexa 488-gekoppeltem Zweitantikörper gefärbt und zusätzlich mit einem direkt markierten Alexa-647-CD29 Antikörper gegen β 1-Integrin inkubiert (siehe Abbildung 4.1.3.1.2). Hier wurde das CD9-Molekül grün gefärbt, wohingegen β 1-Integrin in rot abgebildet ist.

**Abbildung 4.1.3.1.2:**

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahme von Vero-Zellen mit CD9- und β 1-Integrin-Expression vor (A, B, C) und nach (D, E, F) der Inkubation mit 15 µg/ml AK K41. Immunfärbung der CD9-Expression mit mAK K41 (1 : 100) und Alexa 488-gekoppeltem Sekundärantikörper (grün), sowie β 1-Integrin mit dem direkt markierten Antikörper CD29 Alexa-647 (rot). Profile der Fluoreszenzintensitäten der grünen und roten Fluoreszenz entlang der Pfeile sind in (C) und (F) zu sehen; (Konfokales Mikroskop 40fache Vergrößerung (A, D) mit 3facher Zoomansicht eines ausgewählten Bereichs in (B, E)).

Abbildung 4.1.3.1.2 (A) und (B) zeigen unbehandelte Vero-Zellen, deren β 1-Integrin in clusterartigen Zusammenschlüssen innerhalb der Zelle verteilt ist. Außerdem ist das Molekül auch, genauso wie das CD9-Molekül, an den Zellgrenzen vorhanden und akkumuliert dort ebenfalls in kleinen punktartigen Clustern. Vergleicht man dies nun mit Vero-Zellen, die mit dem CD9-Antikörper bei 37 °C vorinkubiert wurden (D, E), sieht man, dass sich das CD9-Molekül, wie erwartet, in netzartigen Strukturen an den Zellgrenzen akkumuliert. Im Gegensatz zu Ewi-F lokalisiert das β 1-Integrin-Molekül nur partiell mit den CD9-Netzstrukturen und ist überdies eher separat in Clustern in der Zelle vorhanden. Gleichwohl steht es mit den CD9-Molekülen innerhalb der Strukturen in Kontakt, was gut in den Überlagerungen des Profils der Fluoreszenzintensität entlang des Pfeils in Abbildung 4.1.3.1.2 (D) in (F) zu sehen ist. Somit konnte abschließend eine partielle Kollokalisierung von β 1-Integrin mit CD9 gezeigt werden.

4.1.3.2 mAK K41-induzierte CD9-Cluster in Abwesenheit von Ewi-F

Nun sollte aufgrund der ausgeprägten Kollokalisierung von Ewi-F mit CD9 die Rolle des Moleküls bei der Ausbildung der netzartigen CD9-Cluster untersucht werden. Dazu wurde mit Hilfe des Silencer® siRNA Starter Kits die Ewi-F-Expression in mit drei spezifischen siRNAs transfizierten HeLa-Zellen reduziert, indem diese zweimal hintereinander mit 100 pmol der siRNA 1, 2 und 3 sowie mit einer negativen Kontroll-siRNA transfiziert wurden (siehe Kapitel 3.2.4). Als Positivkontrolle wurde eine GAPDH-siRNA in einer Konzentration von 30 pmol verwendet. Anschließend wurde als Kontrolle für die Expression und die tatsächliche Downregulation des Ewi-F-Moleküls nach siRNA-Behandlung eine FACS-Analyse vorgenommen (siehe Abbildung 4.1.3.2.1).

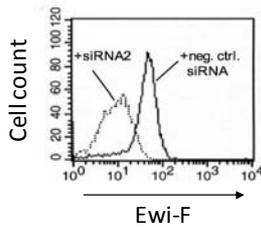
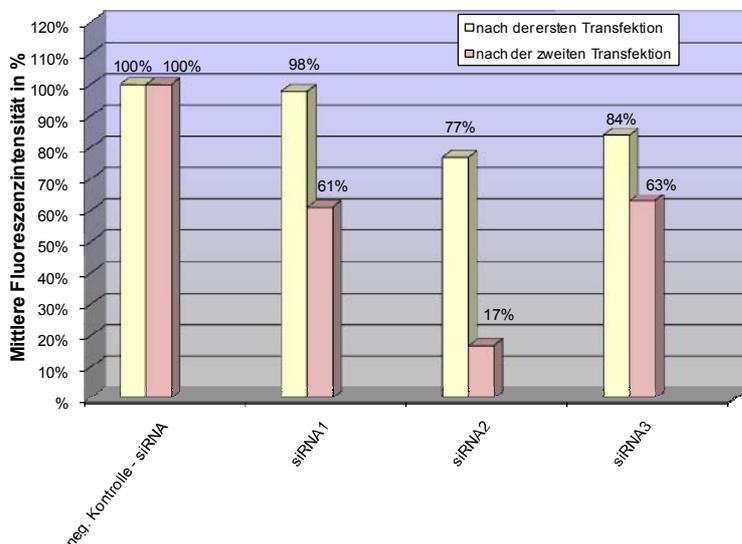


Abbildung 4.1.3.2.1: FACS-Analyse von HeLa-Zellen, die zweimal mit siRNA 2 und negativer Kontroll-siRNA transfiziert wurden; Fluoreszenzfärbung mit Ewi-F (1 : 100) und FITC-gekoppeltem Zweitantikörper (1 : 100).

In Abbildung 4.1.3.2.1 kann man sehen, dass die Ewi-F-Expression nach Behandlung mit siRNA 2 stark zurückgeht. Im Gegensatz dazu exprimieren Vero-Zellen, die mit einer negativen, nicht wirksamen siRNA transfiziert wurden, Ewi-F auf ihrer Oberfläche. Somit konnte gezeigt werden, dass die Herunterregulierung der Ewi-F-Expression tatsächlich durch die Verwendung von siRNA induziert werden konnte.

Weiterhin wurden die verschiedenen siRNAs 1 - 3 auf ihre Fähigkeit getestet, das Ewi-F-Molekül im Vergleich zu der negativen Kontroll-siRNA, in ihrer Expression zu reduzieren. Dabei wurden die mittlere Fluoreszenzintensitäten der Kontrolltransfektion mit nicht-funktioneller siRNA gleich 100 % gesetzt. Die gelben Säulen zeigen die



Werte nach der ersten und die roten Säulen nach der zweiten Transfektion.

Abbildung 4.1.3.2.2: Quantifizierung der Downregulation von Ewi-F in HeLa-Zellen, die mit der jeweiligen siRNA ein- und zweimal transfiziert wurden, bevor sie für die FACS-Färbung mit anti-Ewi-F-Antikörper (1 : 100) und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 100) gefärbt wurden. Die mittleren Fluoreszenzintensitäten der negativen siRNA wurden gleich 100 % gesetzt; Durchschnittswerte wurden aus drei unabhängigen Experimenten gebildet.

Abbildung 4.1.3.2.2 zeigt, in welcher Qualität die einzelnen siRNAs 1 - 3 eine Erniedrigung der Ewi-F-Expression bewirken. Die maximale Reduktion der Ewi-F-Expression konnte mit siRNA 2 erreicht werden, wobei hier eine Erniedrigung der Expression des Ewi-F-Moleküls auf ca. 17 % erzielt werden konnte. Als Negativkontrolle konnte die -siRNA, wie erwartet, die Ewi-F-Expression nicht herunterregulieren. Nach der zweiten Transfektion konnte die Expression von Ewi-F im Fall von siRNA 1 ein wenig, von siRNA 2 sehr stark und im Fall von siRNA 3 nicht gesenkt werden. Somit konnten mit siRNA 2 die besten Werte erzielt werden.

Letztlich wurden HeLa-Zellen nach zweimaliger Transfektion mit siRNA 2 am vierten Tag mit 15 µg/ml mAK K41 für 2 h inkubiert und die Bildung der CD9-Strukturen durch Immunfluoreszenzfärbung mit K41 (1 : 100) und Alexa 594-gekoppeltem Zweitantikörper untersucht (siehe Abbildung 4.1.3.2.3).

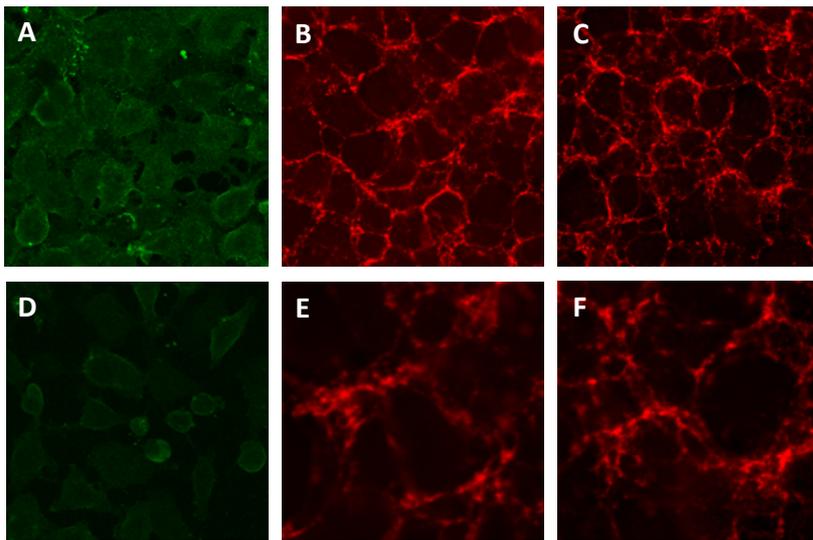


Abbildung 4.1.3.2.3: HeLa-Zellen wurden zweimal mit siRNA gegen GAPDH (A, D), mit -siRNA (B, E; Kontrolle) und mit siRNA 2 gegen Ewi-F (C, F) behandelt und in einer Immunfärbung die CD9- und GAPDH-Expression mit mAK K41 (1 : 100) und Alexa 594-gekoppeltem Sekundäntikörper (rot) (B - C, E - F), sowie anti-GAPDH (1 : 100) und Alexa 488-gekoppeltem Sekundäntikörper (grün A, D) sichtbar gemacht. Vero-Zellen wurden unbehandelt (A - B) oder mit 15 µg/ml mAK K41 (B - E, C - F) für 2 h inkubiert; (Konfokales Mikroskop 20fache Vergrößerung (A - D) mit 4facher Zoomansicht eines ausgewählten Bereichs in E - F).

In Abbildung 4.1.3.2.3 (A) ist die Verteilung von GAPDH innerhalb der HeLa-Zellen zu sehen. Wird dieses Molekül nach zweimaliger Transfektion mit siRNA gegen GAPDH gefärbt, ist deutlich zu erkennen, wie GAPDH stark reduziert auf den Zellen exprimiert wird (D). In Abbildung (B) und (C) sind HeLa-Zellen zu sehen, die ebenfalls zweimal mit -siRNA, als Negativkontrolle (B), und mit Ewi-F siRNA 2 transfiziert wurden (C). In der Färbung ist die CD9-Expression nach der Behandlung mit 15 µg/ml mAK K41 für 2 h zu sehen und in den jeweiligen Vergrößerungen (E, F) ist zu erkennen, dass die Expression von CD9 an den Zellgrenzen gleich bleibt.

Somit bildeten sich in den mit der Negativkontrolle transfizierten Zellen die bereits gezeigten kompakten CD9-Cluster an den Zellgrenzen (E) und nach Erniedrigung der Ewi-F-Expression blieb das CD9-Molekül unverändert in dichten Clustern an den Zellgrenzen erhalten (F). Folglich scheint die Interaktion mit Ewi-F nicht für die Bildung der Tetraspaninstruktur erforderlich zu sein.

4.1.3.3 Die Rolle von Rho-GTPasen und PI-3-K bei der Bildung netzartiger CD9-Strukturen

Da eine der Hypothesen darin bestand, dass eventuell Signalwege bei der Bildung von netzartigen CD9-Strukturen beteiligt sein könnten, die von den Rho-GTPasen Rho, Rac oder Cdc42 gesteuert werden, lag es nahe, die Beteiligung dieser Aktin-assoziierten Moleküle in den Bildungsprozess der CD9-Strukturen zu untersuchen. Da Rho unter anderem für die Ausbildung von fokalen Adhäsionskontakten, Rac für die Ausbildung von Lamellipodien, bestehend aus netzwerkartig polymerisierten Aktin und Cdc42 für die Ausbildung von Filopodien, welche aus Bündeln von Aktinfilamenten bestehen, die durch aktinbindende Proteine vernetzt sind, verantwortlich ist, sollten aufgrund dieser Eigenschaften und Aufgaben Inhibitoren gegen diese GTPasen getestet werden. Weiterhin ist bekannt, dass CD9 über β 1-Integrin den PI-3-K-Signalweg induzieren kann, der wiederum zu einer Aktinpolymerisation führen kann.

Daher wurden Vero-Zellen mit Konzentrationen von 50 - 200 μ M des Rac1-Inhibitors (wirksame Konzentration laut Literatur: 50 - 100 μ M) 2 h vorbehandelt, gleichzeitig mit 15 μ g/ml mAK K41 ÜN oder nach der mAK K41-Inkubation für 2 h inkubiert. Konzentrationen von 100 μ M - 700 μ M und 1 mM wurden von Y-27632 (Rho-assoziiertes Proteinkinase-Inhibitor) in Zellkultur 2 h vor, nach oder gleichzeitig mit 15 μ g/ml mAK K41 verwendet (wirksame Konzentration laut Literatur 140 μ M - 25 mM). Außerdem wurden zum einen Lethal Toxin (*Clostridium sordellii*) gegen Rac1/Cdc42 in Konzentrationen von 0,25 μ g/ml bis zu 15 μ g/ml bei einer Inkubation von 6 h vor oder nach der K41-Inkubation oder gleichzeitig mit 15 μ g/ml mAK K41 ÜN getestet. Des Weiteren wurde Toxin B (*Clostridium difficile*) gegen RhoA/Rac1/Cdc42 in einer Konzentration von 10 ng/ml, die als letzte noch nicht toxische Konzentration durch Titration ermittelt wurde, eingesetzt. In diesem Fall sollte die Inkubation laut Literaturangaben 18 h betragen. Dies wurde aber auf 2 h schrittweise verkürzt, da alle darüber liegenden Inkubationsperioden zu einem Absterben der Vero-Zellen führten. Somit wurde das Toxin 2 h vor oder nach der Inkubation mit 15 μ g/ml mAK K41 inkubiert bzw. gleichzeitig mit 15 μ g/ml mAK K41 für 2 h inkubiert. Im Anschluss wurden die Vero-Zellen mit dem Erstantikörper mAK K41 (1 : 100) und einem Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) gefärbt. Letztlich wurden 50 μ M bis 1 mM des PI-3-Kinase-Inhibitors in gleichen Versuchsansätzen, wie oben beschrieben, angewendet (wirksame Konzentration laut Literatur: 50 μ M). Die Immunfluoreszenzfärbungen wurden dann am Fluoreszenzmikroskop und die CD9-Expression vor und nach der Inhibitor- oder Toxinbehandlung untersucht. Stellvertretend für die Ergebnisse aller Inhibitoransätze wird in Abbildung 4.1.3.3.1 die Behandlung mit dem Rac-1-Inhibitor gezeigt.

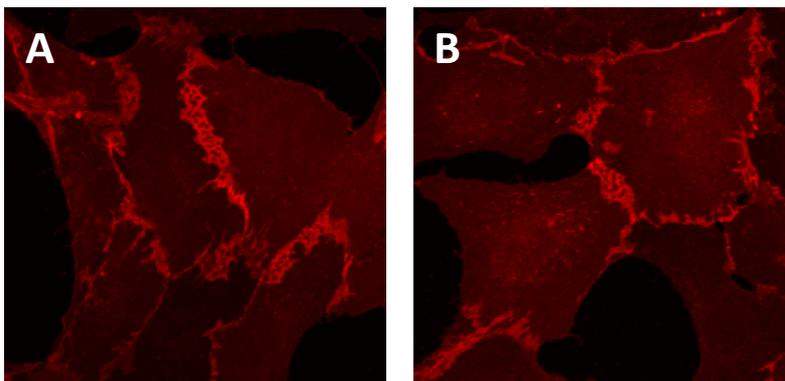


Abbildung 4.1.3.3.1: Fluoreszenz-mikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen, die nur mit 15 μ g/ml mAK K41 (A), oder mit 15 μ g/ml mAK K41 sowie 200 μ M Rac1-Inhibitor (B) bei 37 °C ÜN behandelt wurden. Die Immunfärbung erfolgte mit dem primären Antikörper K41 (1 : 100) und dem Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) (Konfokales Mikroskop; 40fache Vergrößerung).

Vero-Zellen, die mit 15 µg/ml mAK K41 inkubiert wurden, aber keine zusätzliche Inhibitor- oder Toxinzugabe erfuhren, zeigten an den Zellgrenzen die charakteristischen CD9-Strukturen (Abbildung 4.1.3.3.1 (A)). In Abbildung (B) wird der Ansatz des Rac1-Inhibitors (200 µM) mit gleichzeitiger Inkubation von 15 µg/ml mAK K41 gezeigt. Diese Aufnahme ist stellvertretend für alle Ansätze, die mit den unterschiedlichen Inhibitoren oder Toxinen und verschiedenen mAK K41-Inkubationsansätzen durchgeführt worden sind. Hier ist zu sehen, dass trotz Verwendung einer wirksamen Konzentration des Inhibitors keinerlei Einfluss auf die Bildung der CD9-Netzstrukturen besteht. Trotz wiederholter Versuche mit verschiedenen Konzentrationen konnte kein Zusammenhang zwischen den untersuchten Rho-GTPasen, dem PI-3-K-Signalweg und der Ausbildung der Tetraspaninstruktur geknüpft werden.

4.1.4 Verdrängung der CDV-Proteine durch netzartige CD9-Strukturen

Verschiedene zelluläre Transmembranproteine wie Ewi-F interagieren direkt mit CD9, während dies CDV-Oberflächenproteine nicht tun. Trotzdem inhibiert der mAK K41 die CDV-induzierte Zell-Zellfusion. Nach all den bisher beschriebenen Erkenntnissen über die Bildung netzartiger CD9-Strukturen lag die Vermutung nahe, dass das Clustern der CD9-Moleküle eventuell die Zusammensetzung der Plasmamembran und der Tetraspanin-Mikrodomänen an den Zellkontaktstellen so stark veränderte, dass die Zelle und ihre Membran keine Membranfusion mehr zulassen können und daher die CDV-induzierte Fusion eingeschränkt ist.

Normalerweise können die ersten Zeichen der Synzytienbildung, also der Zell-Zellfusion, bei CDV als auch bei MV nach ca. 12 h nach Infektion beobachtet werden. Daher sollte nun in Infektionsansätzen mit CDV und MV, bei dem mAK K41 keinerlei Auswirkungen auf die Synzytienbildung hat, analysiert werden, ob es Unterschiede in der Verteilung der Virusproteine in infizierten, unbehandelten sowie infizierten und gleichzeitig mit 15 µg/ml mAK K41 inkubierten Zellen bestehen. Dazu wurden Vero-Zellen mit MV und CDV mit einer MOI von 1 infiziert und mit bzw. ohne 15 µg/ml ÜN bei 37 °C inkubiert. Nach 24 h wurden die Ansätze in einer Immunfluoreszenz mit mAK K41 (1 : 100), einem polyklonalen Hyperimmunserum gegen CDV (1 : 1.500) oder einem Hyperimmunserum eines Patienten mit SSPE gegen MV (1 : 6.000) eingesetzt. Ein Alexa 594-gekoppelter Antikörper gegen K41 (rot) sowie anti-dog FITC gegen das Hundeserum oder anti-human-Alexa 488 (1 : 100; grün) gegen das SSPE-Serum wurden als Zweitantikörper eingesetzt (siehe Abbildung 4.1.4.1 und 4.1.4.2).

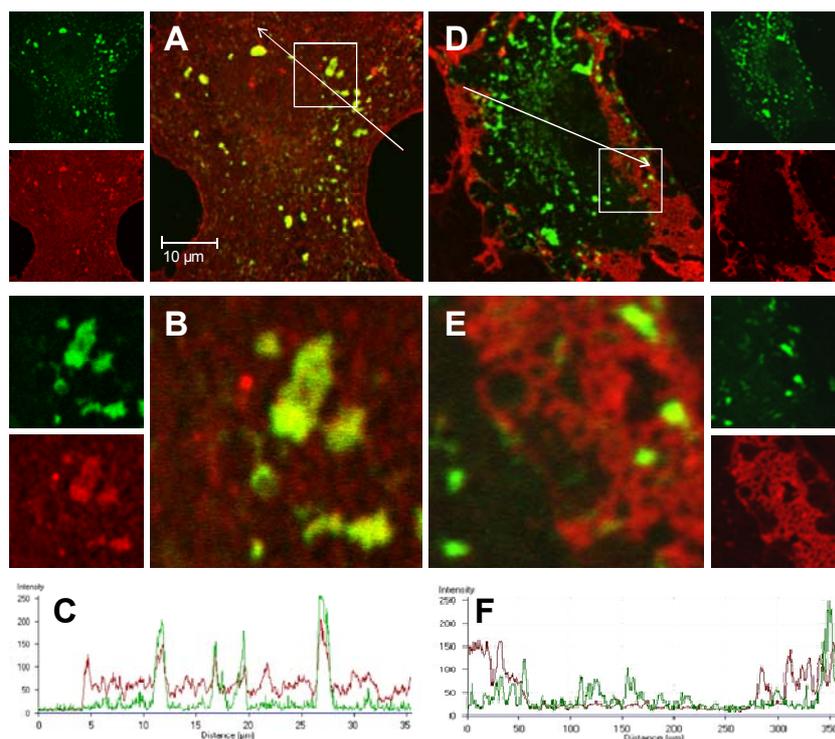


Abbildung 4.1.4.1:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der CD9-Expression und MV-Infektion. Die Immunfärbung der CD9-Expression erfolgte mit mAK K41 (1 : 100) und Alexa 594-gekoppeltem Sekundärantikörper (1 : 200; rot), sowie mit dem Hyperimmunserum eines Patienten mit SSPE gegen MV (1 : 6.000) und anti-human FITC (1 : 100; grün). Vero-Zellen wurden unbehandelt (A - B) oder mit 15 µg/ml mAK K41 (D - F) inkubiert und gleichzeitig mit MV (MOI = 1) infiziert (A - E). Profile der Fluoreszenzintensitäten der grünen und roten Fluoreszenz entlang der Pfeile sind in (C) und (F) zu sehen; (Konfokales Mikroskop 40fache Vergrößerung (A, D) mit 4facher Zoomansicht eines ausgewählten Bereichs in (B, E)).

In Abbildung 4.1.4.1 (A) sind virale MV-Proteine überwiegend in perinukleären Clustern über die Zelle verstreut lokalisiert. Dabei kolokalisieren in unbehandelten Vero-Zellen die Virusproteine teilweise mit den CD9-Molekülen in großen Clustern, was in der Vergrößerung (B) sowie im Profil der Fluoreszenzintensitäten (C) gut zu erkennen ist. Wurden die infizierten Zellen mit 15 µg/ml mAK K41 behandelt (D, E), konnte zunächst die Bildung der charakteristischen CD9-Strukturen an den Zellkontaktstellen beobachtet werden. Zusätzlich zeigte die Verteilung der MV-Virusproteine, dass diese sowohl in der Zelle verteilt blieben, wie dies auch schon in (A) zu sehen war, als auch innerhalb der netzartigen CD9-Cluster an den Zellgrenzen zu finden waren. Diese Zusammenlagerung von MV-Proteinen und CD9 konnte besonders im Profil der Fluoreszenzintensitäten beobachtet werden (F).

In CDV-infizierten Präparaten konnte ebenfalls eine Kolokalisation von CD9-Molekülen und Virusproteinen in nicht vorinkubierten Vero-Zellen beobachtet werden (Abbildung 4.1.4.2 (B, C)). Dabei befanden sich CDV-Proteine innerhalb der Zelle in Clustern zusammengelagert (B), ebenso wie CD9-Moleküle, die aber außerdem noch diffus in der Zelle verteilt waren (A, B). Wurden die Vero-Zellen nun zusätzlich mit 15 µg/ml mAK K41 inkubiert, zeigte sich eine Zusammenlagerung von Virus-Proteinen und CD9-Molekülen im Zytoplasma (D, E), wie dies auch schon in (A) zu beobachten war, aber im Gegensatz zur MV-Infektion konnten keine CDV-Proteine an den Zellgrenzen detektiert werden. Hier waren ausschließlich aus CD9 bestehende Netzstrukturen zu beobachten, was im Profil der Fluoreszenzintensitäten (F) und der Vergrößerung (E) deutlich zu erkennen ist, die nicht mit Virusproteinen kolokalisierten.

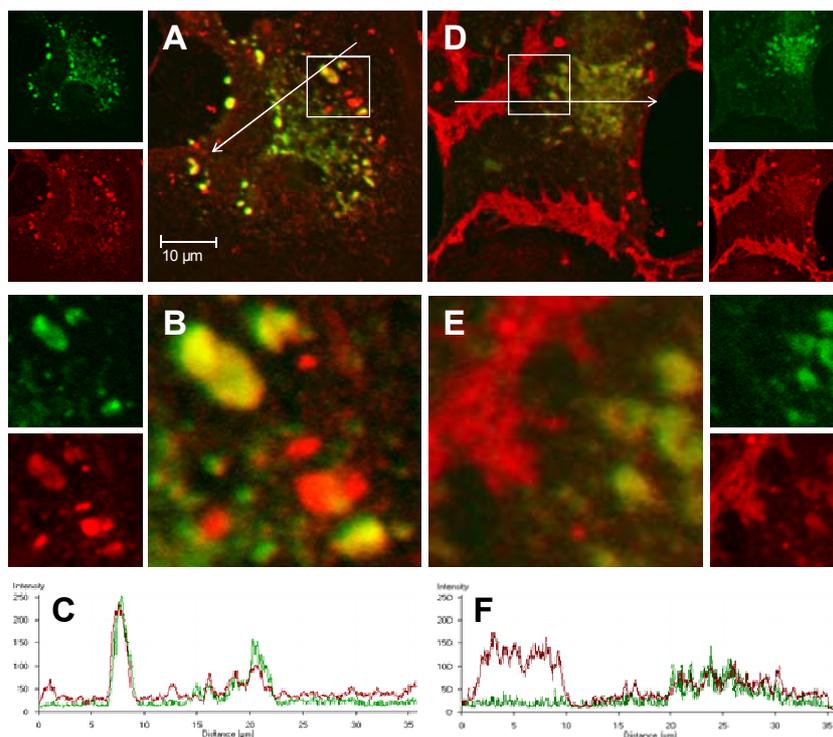


Abbildung 4.1.4.2:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der CD9-Expression und CDV-Infektion. Die Immunfärbung der CD9-Expression erfolgte mit mAK K41 (1 : 100) und Alexa 594-gekoppeltem Sekundärantikörper (1 : 200; rot), sowie mit dog-Hyperimmunserum (1 : 1.500) und anti-dog-FITC (1 : 100; grün). Vero-Zellen wurden unbehandelt (A - B) oder mit 15 µg/ml mAK K41 (D - F) inkubiert und gleichzeitig mit CDV (MOI = 1) infiziert (A - E). Profile der Fluoreszenzintensitäten der grünen und roten Fluoreszenz entlang der Pfeile sind in (C) und (F) zu sehen; (Konfokales Mikroskop 40fache Vergrößerung (A, D) mit 4facher Zoomansicht eines ausgewählten Bereichs in (B, E)).

Abschließend konnte somit gezeigt werden, dass bei der CDV-Infektion, in der CD9-AK die Infektion inhibieren und die Zell-Zellfusion hemmen, die CDV-Proteine im Gegensatz zu den MV-Proteinen sich nicht innerhalb der charakteristischen CD9-Netzstrukturen aufhalten. Somit scheinen K41-induzierte CD9-Cluster die CDV-Proteine von den Zellkontakten zu verdrängen und dies der Grund dafür zu sein, dass die CDV-Infektion mit mAK K41 im Gegensatz zur MV-Infektion, bei der keine Verdrängung zu beobachten war, inhibiert wird.

Die Ergebnisse aus Kapitel 4.1 konnten erfolgreich in Traffic (Singethan et al., 2008) eingereicht und veröffentlicht werden.

4.2 Etablierung eines Inhibitor-Testsystems für die Paramyxovirus-Fusion

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit sollte ein Testsystem für die Paramyxovirus-Fusion von MV, CDV und NiV entwickelt werden, um damit die Untersuchung inhibitorischer Substanzen zu ermöglichen.

So sollte in einem Transfektions-Assay (siehe Kapitel 3.2.4) die Möglichkeit genutzt werden, Plasmide, die die Oberflächenproteine F und H für MV und CDV, sowie das F- und G-Protein für NiV, exprimieren, zu verwenden. Da die Oberflächenproteine primär zu Beginn der Infektion eine Schlüsselrolle spielen und für den Kontakt mit dem Rezeptor (H-Protein) bzw. für die anschließende Fusion der Virus- mit der Zellmembran (F-Protein) essentiell sind, stellen sie ein potentiell Angriffsziel für die Entwicklung von inhibitorischen Substanzen dar. Somit wurden die Vektoren pCG-CDV-H und -F, pCG-MV-H und -F sowie pCG-NiV-G und -F in einer transienten Transfektion mit jeweils 1 µg/ml pro Plasmid eingesetzt, um so eine Synzytienbildung zu induzieren und diese nach ca. 20 h auszuwerten. Dies basierte auf der Erkenntnis, dass in vorherigen Versuchen herausgefunden wurde, dass allein diese beiden viralen Proteine nötig sind, um die Zell-Zellfusion zu induzieren. Dies bietet besonders im Fall von NiV einen besonderen Vorteil, da das Virus als BSL4-Pathogen eingestuft wird. Anschließend sollte die Anzahl der Nuklei pro Synzytium bestimmt werden und dies ein Maßstab für die Wirkungen der gleichzeitig mit der Transfektion inkubierten kleinen inhibitorischen Moleküle sein. Abbildung 4.2.1 zeigt als Beispiel pCG-CDV-H und -F transfizierte Vero-Zellen, die in (A) ohne und in (B) zusätzlich mit einer potentiellen inhibitorischen Substanz ÜN für 20 h inkubiert wurden. Dies soll stellvertretend als anschauliches Beispiel für das Testsystem gezeigt werden.

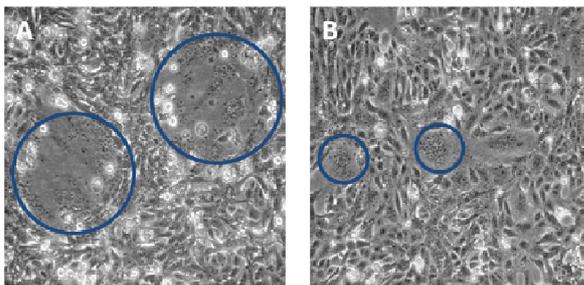


Abbildung 4.2.1: Lichtmikroskopische Aufnahmen von pCG-CDV-H und -F transfizierten Vero-Zellen ohne (A) und mit Inkubation einer potentiellen inhibitorischen Substanz (B). Die Nuklei pro Synzytium (im Kreis markiert) können gezählt werden. Die Abnahme ihrer Menge ist ein Maßstab für die Wirkung des Inhibitors; (Lichtmikroskop; 10fache Vergrößerung).

Weiterhin wurden verschiedene Konzentrationen der Testsubstanzen eingesetzt, beginnend bei einer Konzentration von 200 µM, 100 µM und 50 µM, um eine Vorauswahl potentiell wirkender Substanzen zu ermöglichen. Die durchgetesteten Substanzen wurden danach jeweils in NiV-, MV- und CDV-hemmende Gruppen eingeteilt. Tabelle 4.2.1 zeigt alle im Rahmen dieser Doktorarbeit untersuchten Verbindungen und ihre Einteilung in hemmende und nicht hemmende Substanzen.

Getestete Substanzen	Formel	Effekt	Getestete Substanzen	Formel	Effekt
QD7-2	C15H18FN3O2	schwache Inhibition	TG102	C19H19N3O5	schwache Inhibition NIV
QD2-2	C16H18N4O2	starke Inhibition bei MV, leichte bei NIV, keine bei CDV	TG14	C19H21N3O3	keine Inhibition
QD2-3	C16H19N3O4	starke Inhibition bei MV, CDV, NIV	QED16-9	C20H18CIFN2O3	schwache Inhibition
QD2-1	C18H13N3O2	keine Inhibition	QED6-10	C19H16F3N3O2	keine Inhibition
QD5-1	C18H13F3N2O2	keine Inhibition	QED15A	C19H20FN3O4	schwache Inhibition
QD6-1	C18H13F3N2O2	keine Inhibition	JS06	C19H22N2O2	schwache Inhibition
QD7-1	C17H13FN2O2	keine Inhibition	MT01	C19H21N3O4	starke Inhibition bei MV und CDV, leichte bei NIV
QED6-11	C19H13CIF4N2O2	Inhibition bei MV, NIV, CDV	MM7a	C22H29N4O4Br	keine Inhibition
QED6-6	C20H17F3N2O3	keine Inhibition	JS08	C26H34N2O2Br2	keine Inhibition
QED15A-12	C26H25Cl2FN4O3	starke Inhibition bei MV, NIV, CDV	MM4b	C44H56N4O4Br2	keine Inhibition
JK8/2	C26H27N3O9	schwache Inhibition bei MV und NIV, starke bei CDV	MM3f	C42H52N4O4Br2	keine Inhibition
OX-1 (Ref1)	C14H13CIN2O	starke Inhibition bei MV und CDV, keine bei NIV	MT04	C44H54N6O8Br2	keine Inhibition
TG46.2F	C7H15CIN2O	keine Inhibition	MT06	C44H58N6O6Br2	schwache Inhibition
QED6-7	C17H17F3N2O2	keine Inhibition	MM3a	C38H50N4O4Br2	keine Inhibition
QED6-9	C21H19F3N2O3	keine Inhibition	MM3i	C38H49N5O6Br2	keine Inhibition
QED6-10	C19H16F3N3O2	keine Inhibition	MM3j	C38H51N5O4Br2	schwache Inhibition
QED5-13	C20H18F3N3O2	keine Inhibition	MM8afp	C38H44N4O4Cl2	Inhibition bei CDV, keine bei MV und NIV
MM3C	C39H52N4O4Br2	leichte Inhibition bei CDV, keine bei MV und NIV	MT02	C44H54N6O8Br2	leichte Inhibition bei MV, keine bei CDV und NIV
MT05	C44H58N6O4Br2	leichte Inhibition bei MV, keine bei CDV und NIV	MM6	C37H49N5O6Br2	Inhibition bei MV, keine bei CDV und NIV
JSW155	C17H17N3O4	keine Inhibition	GH02	C15H12	starke Inhibition bei MV und CDV, keine bei NIV
QED7-10	C18H16FN3O2	keine Inhibition	GH35	C15H13O3	keine Inhibition bei NIV, MV; CDV
JK41	C7H6CIN3	starke Inhibition bei CDV und MV, leichte bei NIV	GH43	C16H15O3	keine Inhibition bei NIV, CDV, leichte bei MV
JK80	C11H14N4OS	starke Inhibition bei CDV und MV, leichte bei NIV	GH18	C15H13N3O4	keine Inhibition bei NIV, MV, CDV
QED15B-12	C27H28Cl2FN3O4	starke Inhibition bei CDV, MV, NIV	GH36	C15H13N3O4	keine Inhibition bei NIV, starke bei MV; CDV
QED6-8	C20H16CIF3N2O2	Inhibition bei NIV, starke bei CDV, NIV			

Tabelle 4.2.1: Auflistung der getesteten Substanzen in der NIV-F und -G, CDV-F und -H, MV-F und -H induzierten Zell-Zellfusion mit Angaben zur Wirkung nach Testung in den anfänglichen Substanzen 200 μM , 100 μM und 50 μM .

Auf Basis dieser Voruntersuchungen konnten nun für das Testsystem mit MV- und CDV-F- und -H exprimierenden Vektoren sowie für NIV-F und -G exprimierenden Plasmiden dosisabhängige Wirkungskurven in stufenweisen Konzentrationen von 0 μM - 20 μM getestet werden.

4.2.1 Zellvitalität nach der Behandlung mit ausgewählten Substanzen

Da die zu testenden Substanzen in Konzentrationen von 0 μM , 0,5 μM , 1 μM , 2 μM , 4 μM , 8 μM , 10 μM und 20 μM untersucht werden sollten, um dosisabhängige Wirkungskurven zu erhalten, mussten diese zuvor auf ihre Zelltoxizität untersucht werden. Da die Grundstoffe alle in DMSO gelöst werden mussten, weil sie eine relativ niedrige Wasserlöslichkeit besitzen, bestand die Vermutung, dass diese in hoch eingesetzten Konzentrationen und aufgrund ihrer Zusammensetzung toxisch auf die behandelten Vero-Zellen wirken könnten. Daher wurden die verwendeten Konzentrationen der Stoffe im Verhältnis auf die Gesamtmenge der in den Versuchen verwendeten Konzentration an DMSO umgerechnet und ermittelt (siehe Tabelle 4.2.2.1). Zusätzlich wurde DMSO in verschiedenen Konzentrationen auf Vero-Zellen gegeben, um zu testen, bei welchen Mengen die Vero-Zellen abstarben bzw. sich ihre Zellvitalität verringerte. Nach dem genauen Zeitablauf wie in den Transfektions-Assays zur Untersuchung der Substanzen, wurden diese auf den unbehandelten Vero-Zellen für 20 h bei 37 °C inkubiert und anschließend das Medium für 2 h gegen frisches ausgetauscht. Dann konnte unter Zugabe des Tetrazolium-Salzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazoliumbromide (MTT), was nur in lebende Zellen aufgenommen wird, ein Farbumschlag in ein violettes Formazanprodukt beobachtet werden (siehe Kapitel 3.1.6). Diese violetten Kristalle können nicht durch die zelluläre Membran austreten und sind nicht löslich. Somit wurden die Vero-Zellen zuerst gewaschen und anschließend die Kristalle mit einem organischen Lösungsmittel aus den Zellen extrahiert und der Farbumschlag bei 590 nm gemessen. Da nur vitale, intakte Zellen und solche, die in einer sehr frühen Phase der Apoptose sind, diese Umwandlung von MTT in die Formazankristalle ausführen können, ist der Farbumschlag eine gute Methode, die Vitalität der Zellen zu messen. Dabei wurden jeweils 12 Werte pro Ansatz gemessen und ein Mittelwert gebildet, der im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet wurde (siehe Abbildung 4.2.1.1).

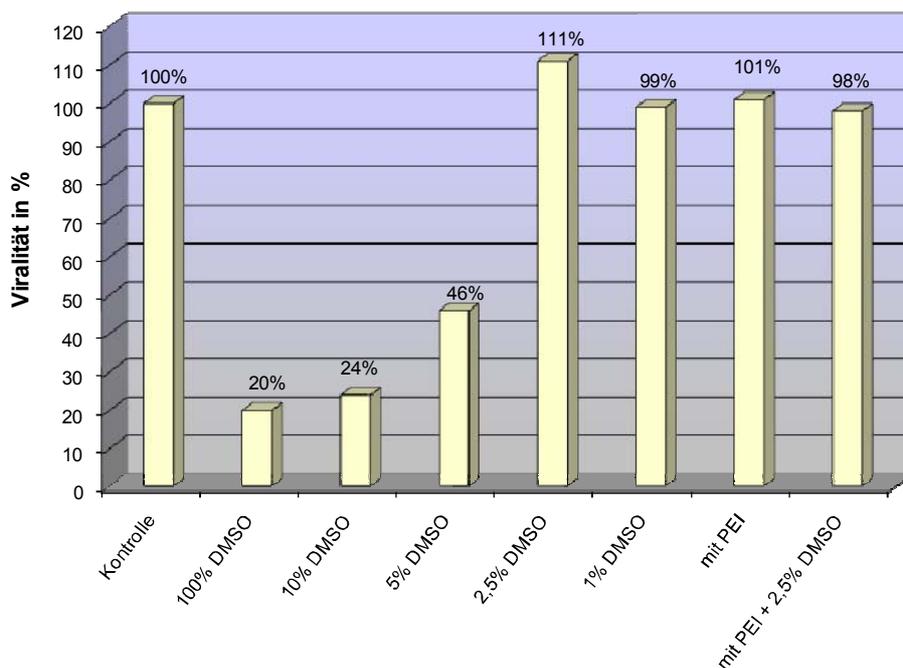


Abbildung 4.2.1.1: Vitalitätstest von Vero-Zellen mit Hilfe des MTT-Tests. Verschiedene DMSO-Konzentrationen wurden für 20 h auf Vero-Zellen im 5 % FKS MEM-Medium inkubiert und am nächsten Tag die Fähigkeit der Zellen gemessen, MTT in Formazan umzuwandeln, was ein direkter Nachweis für die Vitalität der Zellen ist. Die Werte wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Die Kontrolle wurde mit 5 % FKS MEM-Medium behandelt.

Bei den Kontrollzellen, die ohne weitere Zugabe von DMSO in Medium gehalten wurden, ist klar zu sehen, dass sie vital und gesund sind (Abbildung 4.2.1.1 Reihe 1). Bei denjenigen Zellen, die ÜN mit 100 % oder 10 % DMSO behandelt wurden waren sehr viele abgestorben. Mit einer Gesamtkonzentration von 5 % DMSO waren bereits knapp 50 % der Zellen wieder vital und dies konnte sich für die Gesamtkonzentrationen von 2,5 % bzw. 1 % auf 100 % gesunde Zellen verbessern (Reihe 5, 6). Damit konnte gezeigt werden, dass bei einem Wert von bis 2,5 % DMSO im Gesamtansatz Vero-Zellen diese Menge durchaus tolerieren und normale vitale Funktionen aufweisen. Da in den ausgeführten Transfektions-Assays die DMSO Gesamtkonzentration nur selten über 2,5 % ging (siehe Tabelle 4.2.2.1) und dies auch nur dann, wenn Konzentrationen ab 8 μM und mehr verwendet wurden, musste dies für die hohen Konzentrationen immer berücksichtigt werden.

Zusätzlich wurden Vero-Zellen getestet, die nur mit PEI behandelt wurden, was für die Vitalität der Zellen in Transfektions-Assays von Bedeutung war. Hier konnte beobachtet werden, dass dieses Transfektionsreagenz vollständig von den Zellen toleriert wurde und deren Zustand nicht negativ beeinflusste. In Kombination mit 2,5 % DMSO (Abbildung 4.2.1.1 Reihe 8) war PEI für die Zellkultur fortwährend verträglich.

Verwendete Substanzen	Gesamt DMSO-Gehalt bei 4 μM Endkonzentration/ml	Verwendete Substanzen	Gesamt DMSO-Gehalt bei 4 μM Endkonzentration/ml
QD2-3	3,00 %	MT01	2,00 %
JK8/2	0,01 %	QED6-11	2,50 %
QED15A-12	0,10 %	QED15B-12	2,50 %
JK80	0,01 %	GH02	0,01 %
Ref1 (Ox-1)	0,10 %	GH35	0,01 %
JK41	0,01 %	GH43	0,01 %
QD2-2	1,00 %	GH18	0,01 %
QED6-8	2,50 %	GH36 (AS-48)	0,01 %

Tabelle 4.2.2.1: Gesamt-DMSO-Gehalt in % in einem Endvolumen von 1 ml bei einer verwendeten Konzentration von 4 μM der Substanzen. Alle Substanzen, außer QD2-3, liegen in diesen Konzentrationen im Bereich von bis zu 2,5 %, in dem die Zellen absolut vital sind.

In Tabelle 4.2.2.1 kann zusätzlich der DMSO-Gehalt sämtlich verwendeter Substanzen betrachtet werden, wenn diese im Gesamtvolumen der Transfektions- oder Infektionsansätze von insgesamt 1 ml eingesetzt wurden. Dabei ist deutlich zu erkennen, dass mit Ausnahme von QD2 - 3 alle Substanzen in einem gesamten DMSO-Gehalt von bis zu 2,5 % in Konzentrationen von 4 μM verwendet wurden. Daher musste besonders bei der Verwendung von höheren Konzentrationen zwischen 8 μM und 20 μM darauf geachtet werden, bei der Interpretation der Ergebnisse stets die Gesamtkonzentration des Lösungsmittels, abhängig von der verwendeten Substanz, zu berücksichtigen.

Des Weiteren sollten nun auch noch die Auswirkungen der Substanzen selbst, die sich in DMSO als Lösungsmittel befanden, getestet werden. Dazu wurden wiederum Vero-Zellen mit allen verwendeten Konzentrationen von 0,5 μM - 20 μM für 20 h bei 37 °C inkubiert, um anschließend nach der oben beschriebenen Methode für den MTT-Test vorbereitet zu werden. Nach der Messung der unterschiedlichen Werte konnten diese in Prozent im Verhältnis zur Kontrolle umgerechnet und in folgenden Abbildungen 4.2.1.2 und 4.2.1.3 für zwei verschiedene Substanzgruppen gezeigt werden. Für alle drei Viren wurden zwei Substanzgruppen getestet. Dabei handelte es sich um die Gruppe der Chinolon-Derivate (QED- und GH-Substanzen). Beide Gruppen wurden auf Basis von Stoffen entwickelt, die aufgrund von Ähnlichkeitssuchen von bereits veröffentlichten wirksamen Inhibitoren Ox-1 und AS 48 (Plempner et al., 2004) abgeleitet und verändert wurden. Diese Basis wurde als Positivkontrolle in allen Transfektionsansätzen verwendet und im Fall von Ox-1 als Referenz-Substanz 1 sowie im Fall von AS 48 als GH36 bezeichnet.

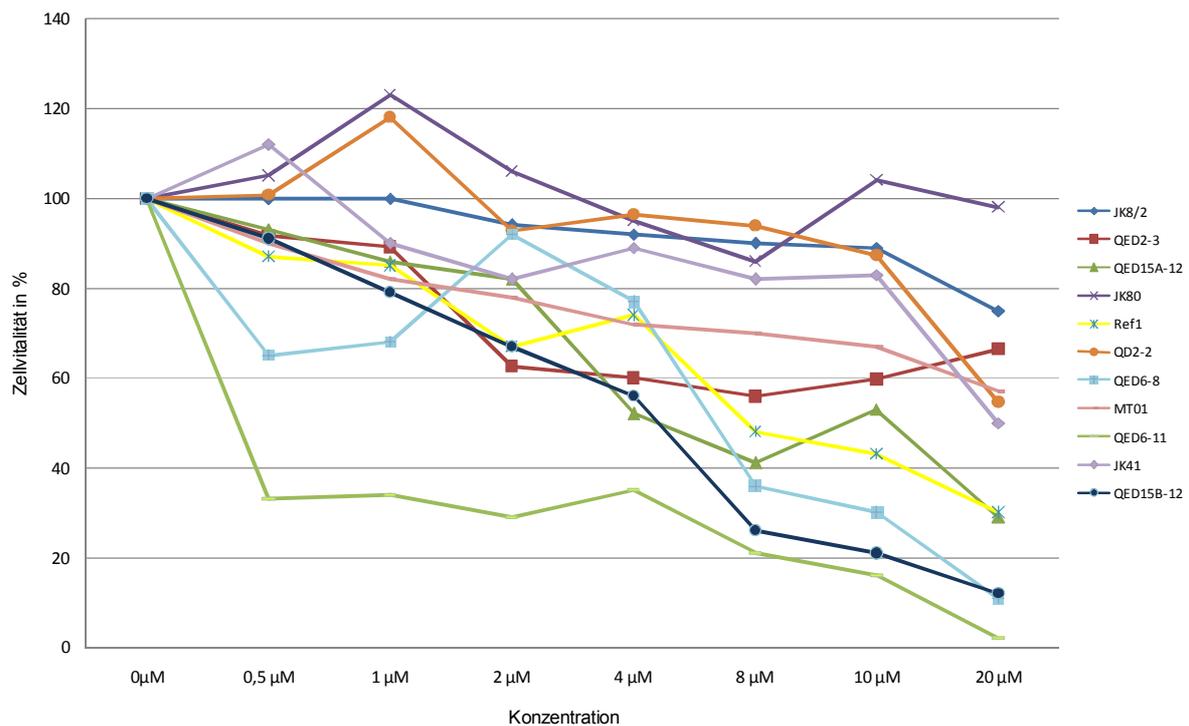


Abbildung 4.2.1.2: Vitalitätstest von Vero-Zellen. Konzentrationen von 0 μM - 20 μM wurden für 20 h auf Vero-Zellen inkubiert und am nächsten Tag die Fähigkeit der Zellen gemessen, MTT in Formazan umzuwandeln, was ein direkter Nachweis für die Vitalität der Zellen ist. Die Werte wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet.

In Abbildungen 4.2.1.2 konnte gezeigt werden, dass die meisten Substanzen der QED-Substanzgruppe, mit Ausnahme von QED6 - 11, bis zu einer Verwendung von 4 μM absolut tolerierbar für die Vero-Zellen waren, da knapp 60 % bis zu fast 100 %, abhängig von der verwendeten Substanz, vital waren. Dies war auch der Wert, bei dem Substanzen wie QED6 - 11 oder QED6 - 8 den Grenzwert der für die Zellen tolerablen DMSO-Konzentrationen erreichten, der bei 2,5 % DMSO im Gesamtvolumen lag. Betrachtet man aber die Zellvitalität bei Verwendung von 4 μM QED6 - 8 in Abbildungen 4.2.1.2 kann man erkennen, dass die DMSO-

Gesamtkonzentration von 2,5 % hier nicht toxisch auf die Zellen wirkt. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass die Kombination der Substanz mit dem Gesamtanteil an DMSO im Transfektionsansatz vermutlich über das Überleben der Zellen bestimmen. Dies ist am Beispiel von QED6 - 11 zu sehen, dessen Verwendung in geringen Konzentrationen zum Verlust der Zellvitalität führt. Hier kann die Toxizität von DMSO nicht verantwortlich für das Absterben der Zellen sein, da dies von 0,5 μM bis 1 μM nur in sehr geringen Mengen im Gesamtansatz vertreten ist.

In Abbildungen 4.2.1.3 wird die Vitalität von Vero-Zellen nach Behandlung mit der GH-Substanzgruppe gezeigt. Hier ist zu beobachten, dass nach Zugabe von 4 μM GH36 immer noch knapp 70 % der Zellen gesund sind. Bei allen Substanzen liegt die Zellvitalität auch bei hohen Konzentrationen immer noch bei ca. 60 % und darüber, was bedeutet, dass diese Substanzgruppe, die auf der Basis von GH36 synthetisiert wurde, auch in hohen Konzentrationen immer noch relativ atoxisch ist.

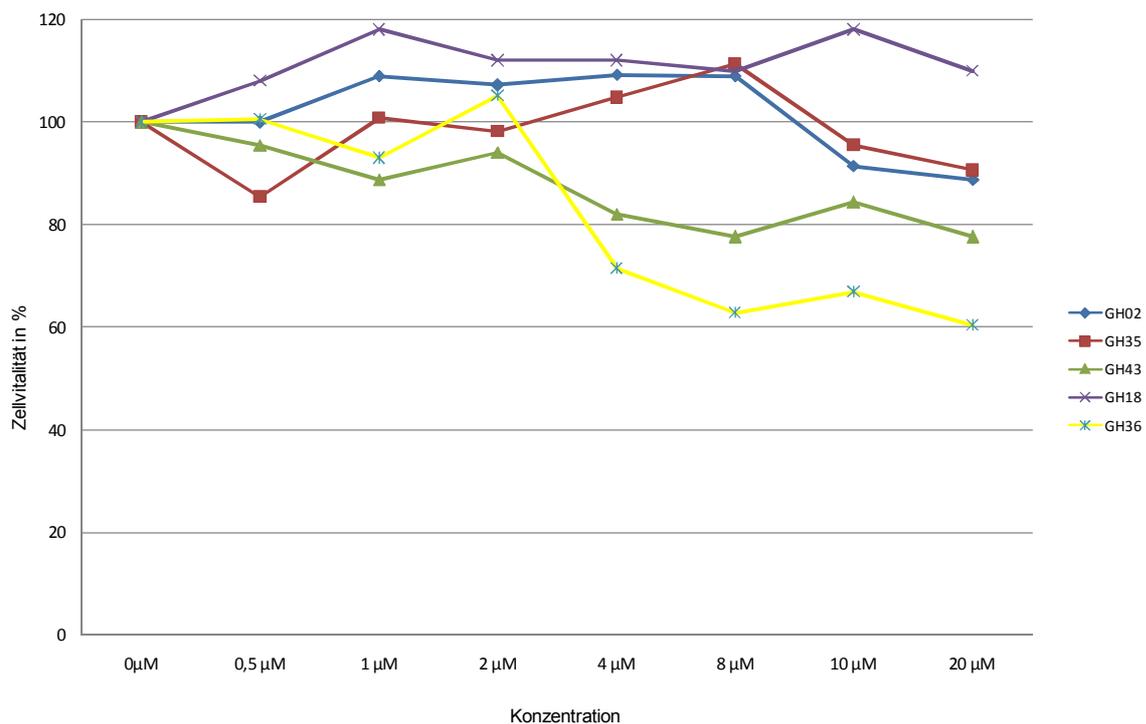


Abbildung 4.2.1.3: Vitalitätstest von Vero-Zellen mit Hilfe des MTT-Tests. Konzentrationen von 0 μM - 20 μM wurden für 20 h auf Vero-Zellen inkubiert und am nächsten Tag die Fähigkeit der Zellen gemessen, MTT in Formazan umzuwandeln. Die Werte wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet.

4.2.2 Untersuchungen von Inhibitoren gegen CDV

4.2.2.1 Testung der Substanzen in der transfektionsabhängigen CDV-F und -H induzierten Zell-Zellfusion

Wie bereits in Kapitel 4.2 beschrieben, wurden pCG-CDV-H und -F exprimierende Vektoren in Vero-Zellen einer 6-well-Platte mit PEI transfiziert. Da PEI ein sehr mildes und atoxisches Transfektionsreagenz ist (siehe Kapitel 4.2.1), konnte dessen Wirkung auf die verwendeten Zellen vernachlässigt werden. Gleichzeitig wurden zwischen 0,5 μM und 20 μM der zu untersuchenden Substanzen zum Transfektionsansatz zugegeben und alles ÜN für 20 h bei 37 °C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen mit 4 % PFA fixiert und die Zell-Zellfusion in jedem Napf analysiert. Dafür wurden an fünf verschiedenen Stellen insgesamt 20 Synzytien im Präparat gezählt. Die Versuche wurden für jede Substanzgruppe drei Mal wiederholt und der Mittelwert gebildet. Schließlich wurden alle Werte im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet, deren Standardabweichungen bestimmt und in folgenden Graphen dargestellt (Abbildung 4.2.2.1.1 und 4.2.2.1.2).

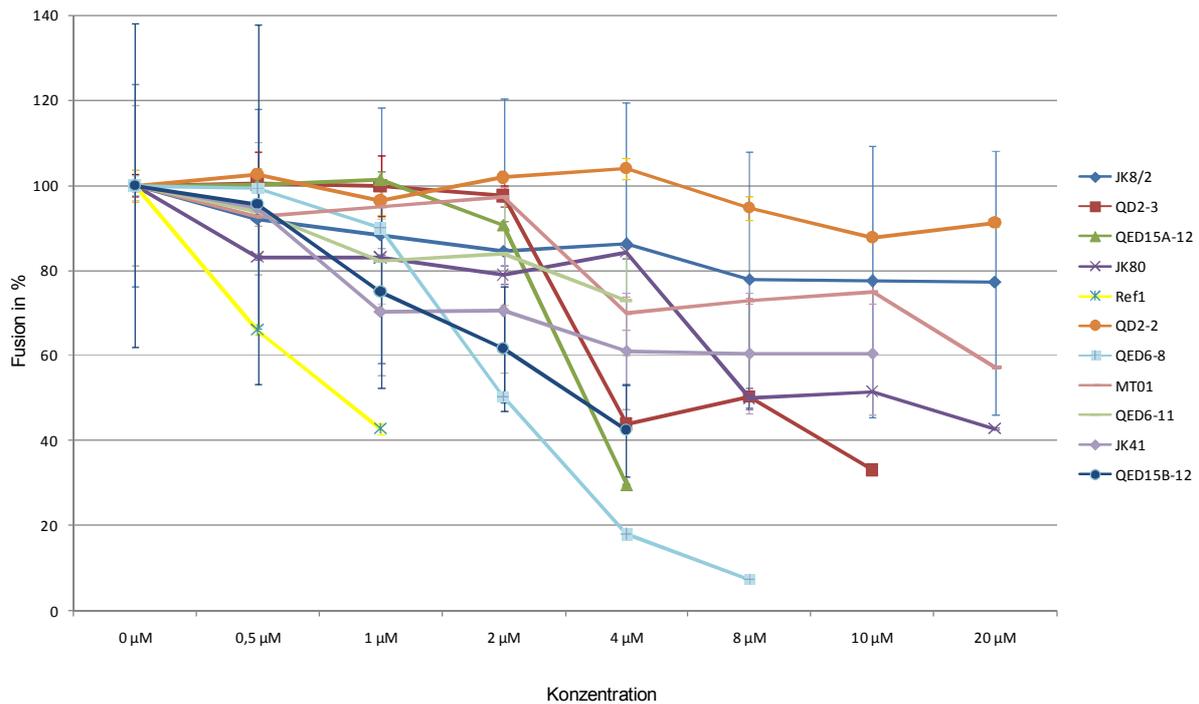


Abbildung 4.2.2.1.1: Dosisabhängige Testung verschiedener Substanzen auf Vero-Zellen, die mit pCG-CDV-F und -H transfiziert und in Konzentrationen von 0 µM - 20 µM für 20 h bei 37 °C inkubiert wurden. Die Reduktion der Zellfusion, die durch das Ermitteln der Synzytiengröße (Zählen der Nuklei pro Synzytium in 5 verschiedenen Bereichen des Präparats) beurteilt werden konnte, diente dabei als Maß für die Wirkung der Inhibitoren. Die Werte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

Betrachtet man Abbildung 4.2.2.1.1 so ist zu erkennen, dass die Referenzsubstanz Ref1 (Ox-1) in sehr niedrigen Konzentrationen von 0,5 µM bis 1 µM sehr effizient (ca. 60 %) die CDV-Fusion hemmt. Allerdings ist sie bereits in einer Konzentration von 2 µM so toxisch, dass alle Zellen in den Transfektions-Assays abstarben. Dies scheint aber nicht an der Zelltoxizität von Ref1 zu liegen, sondern an der Kombination des verwendeten Transfektionsreagenzes und der Substanz selbst, wobei beide alleine zu keiner Toxizität führen. Im Vergleich dazu gibt es nur zwei Substanzen, nämlich QED6-8 und QED15A-12, die, allerdings unter Verwendung höherer Dosen bis zu 4 µM, effizient die CDV-Transfektion hemmen, so dass nur noch ca. 20-30 % Fusion stattfinden können - die Hemmung beträgt hier also bis zu 80 %. Substanzen wie QD2-2 zeigten keinerlei Effekt auf die pCG-CDV-F und -H induzierte Synzytienbildung. QED15B-12 und QD2-3 konnten die Fusion der Vero-Zellen im Schnitt um ca. 60 % hemmen, was dem Wert der Hemmung von Ref1 entsprach, allerdings unter Verwendung einer höheren Konzentration.

Im Anschluss wurden die Ergebnisse der Transfektions-Assays ausgewertet, in denen die GH-Substanzen verwendet worden waren (siehe Abbildung 4.2.2.1.2). Diese wurden, ebenso wie die Substanzgruppe davor, gleichzeitig mit dem Transfektionsmix aus PEI und pCG-CDV-F und -H auf den Zellen für 20 h bei 37 °C inkubiert. Anschließend wurden die entstandenen Synzytien, wie oben beschrieben, gezählt und der Mittelwert aus drei unabhängigen Versuchen gebildet. Dabei konnte beobachtet werden, dass die Referenzsubstanz GH36 (AS 48) die CDV-Transfektion bis zu ca. 80 % hemmen konnte, was bisher nur für MV gezeigt worden war (Plemper et al., 2004). Zusätzlich zeigte jedoch eine andere Substanz namens GH02 eine leicht bessere Hemmung, um die 90 % in Konzentrationen ab 8 µM bis 10 µM. Da besonders GH02 völlig atoxisch für die Zellen war, wie der Zellvitalitätstest zeigte (siehe Kapitel 4.2.1), kann hier von einer tatsächlichen Hemmung ausgegangen werden. Substanzen wie GH18 oder GH35 konnten die Synzytienbildung der CDV-Transfektion eher nicht hemmen und scheiden daher als potentielle Hemmstoffe aus. Alle GH-Substanzen konnten aber im Vergleich zur Referenzsubstanz 1 bei 1 µM keine ähnlich starken Auswirkungen auf die CDV-induzierte Zell-Zellfusion zeigen.

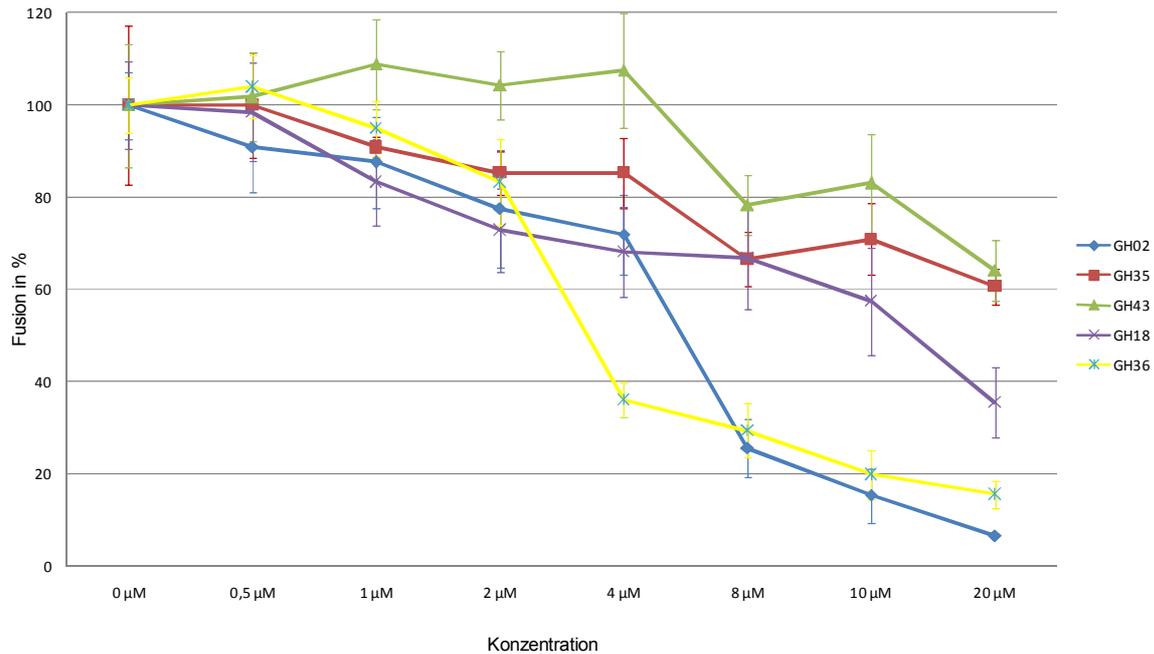


Abbildung 4.2.2.1.2: Dosisabhängige Testung verschiedener Substanzen auf Vero-Zellen, die mit pCG-CDV-F und -H transfiziert und mit Konzentrationen 0 µM - 20 µM für 20 h inkubiert wurden. Die Reduktion der Zellfusion diente dabei als Maß für die Wirkung der Inhibitoren. Die Werte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

4.2.2.2 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung potentieller Inhibitoren in der transfektionsabhängigen CDV-F und -H induzierten Zell-Zellfusion

Nachdem die potentiell wirksamen Substanzen in Transfektions-Assays ermittelt worden waren, wurden die Ansätze in Immunfluoreszenzfärbungen weiter verarbeitet. Hierzu wurden die Zellen zusätzlich permeabilisiert und mit dog-Hyperimmunserum (1 : 1.500) sowie DAPI (1 : 300) und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 100) gefärbt. Somit konnte die Inhibition der Synzytienbildung anhand der Größe der gebildeten Riesenzellen gezeigt werden (siehe Abbildung 4.2.2.2.1).

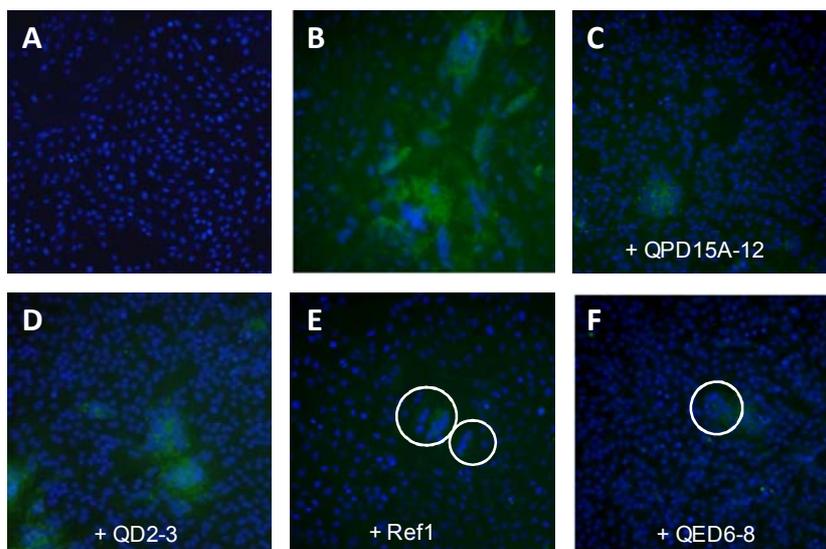


Abbildung 4.2.2.2.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Synzytienbildung mit und ohne Inhibitoren. Vero-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für CDV-F und -H transfiziert (B) und anschließend in einer Immunfärbung mit dog-Hyperimmunserum (1 : 1.500) und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper inkubiert. Die Inhibitoren wurden direkt nach Transfektion für 20 h bei 37°C zugegeben. (A) Unbehandelte Kontrollzellen; Nuclei wurden mit DAPI (1 : 300) gefärbt. (B) Kontrollzellen ohne Inhibitor. (C - F) Zellen mit 4 µM QED15A -

12, QD2 - 3, QED6 - 8 und 1 µM Ref1. Kreise: Vergleich der Synzytien in Ref1 und QED6 - 8 behandelten Vero-Zellen; (Fluoreszenzmikroskop, 10fache Vergrößerung).

Bei genauer Betrachtung von Abbildung 4.2.2.2.1 bestätigten sich die Ergebnisse aus der Graphik in Abbildung 4.2.2.1.1. Ref1, QED6 - 8, QED15A - 12 waren die am besten wirkenden Substanzen und konnten die Synzytienbildung deutlich unterdrücken. So konnte mit nur 1 μM von Ref1 die Synzytiengröße im Vergleich zu 4 μM bei QED6 - 8 deutlich gesenkt werden. QED6 - 8 zeigte bei 4 μM allerdings eine stärkere Synzytienhemmung als Ref1 bei 1 μM (E, F). Als Vergleich wurde in (D) die Substanz QD2 - 3 gezeigt, die die Fusion ebenfalls hemmen konnte, allerdings nicht in dem Maße, wie die Inhibitoren in Abbildung (E - F).

In Abbildung 4.2.2.2.2 ist im Vergleich die Auswirkung von GH02 (C) und GH36 (D) auf die Fusion im Transfektions-Assays von CDV-H und -F exprimierenden Vektoren zu sehen. Hier ist deutlich zu erkennen, dass sowohl GH02 als auch GH36 die Zellfusion im Gegensatz zu unbehandelten Vero-Zellen (B) hemmen. In (A) ist hingegen die Kontrolle von untransfizierten und unbehandelten Zellen zu sehen. GH02 und GH36 waren auch die Substanzen, die aus dem dosisabhängigen Inhibitortest als am effektivsten wirkende Hemmstoffe hervorgingen. Somit konnten diese Ergebnisse auch in der Immunfluoreszenzfärbung bestätigt werden. Alle anderen Substanzen zeigten nur wenig Auswirkung auf die Synzytiengröße und werden daher nicht gezeigt.

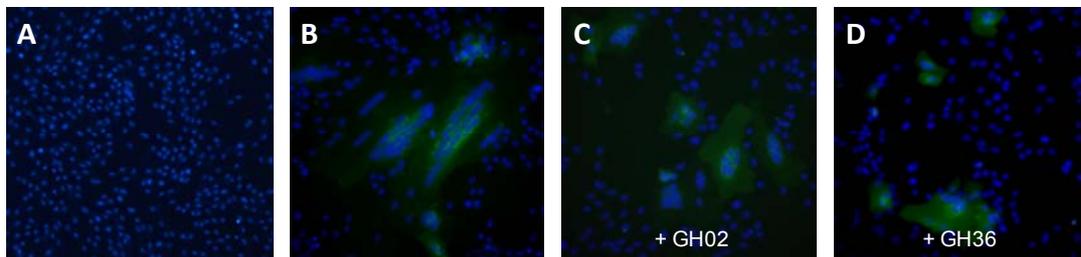


Abbildung 4.2.2.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Synzytienbildung mit und ohne Inhibitoren. Vero-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für CDV-F und -H transfiziert (B) und anschließend in einer Immunfluoreszenz mit dog-Hyperimmunserum (1 : 1.500) und einem FITC-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 100) gefärbt. Die Inhibitoren wurden direkt nach Transfektion für 20 h bei 37°C zugegeben. (A) Unbehandelte Kontrollzellen; Nuklei wurden mit DAPI (1 : 300) gefärbt. (B) Kontrollzellen ohne Inhibitor. (C - D) Zellen mit 8 μM GH02 und GH36. (Fluoreszenzmikroskop, 10fache Vergrößerung).

4.2.2.3 Testung der Substanzen in der CDV-Infektion

Um die bereits in der Transfektion als potentiell inhibitorisch eingestuft Substanzen weiter zu testen, wurden diese in einem Infektions-Assay eingesetzt, in dem sie direkt nach Infektion mit einer $\text{MOI} = 1$ in Konzentrationen von 0 μM bis 4 μM zugegeben wurden. Nach 20 h bei 37 °C wurden die Zellen analysiert, indem sie fixiert wurden, um anschließend in fünf verschiedenen Bereichen des Napfes die Zell-Zellfusion durch Auszählen der Nuklei zu bestimmen. Diese wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet und deren Standardabweichungen bestimmt. Alle Konzentrationen wurden in drei unabhängigen Versuchen wiederholt und daraus der Mittelwert gebildet (siehe Abbildung 4.2.2.3.1).

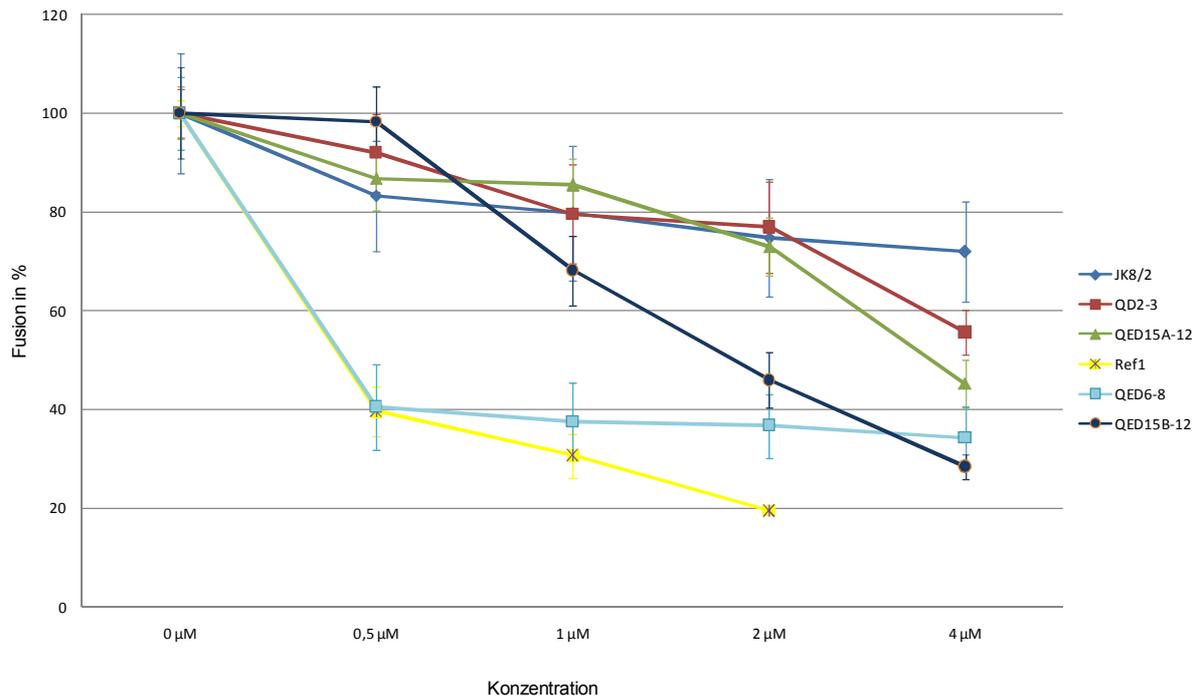


Abbildung 4.2.2.3.1: Dosisabhängige Testung verschiedener Inhibitoren auf Vero-Zellen, die mit CDV infiziert wurden (MOI = 1) und mit Konzentrationen von 0 µM - 4 µM für 20 h inkubiert wurden. Die Zellfusion diente dabei als Maß für die Wirkung der Inhibitoren. Die Werte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

Betrachtet man Abbildung 4.2.2.3.1 genau, kann festgestellt werden, dass die Inhibitoren offensichtlich etwas anders als in der CDV-Transfektion wirkten. Im Gegensatz zur Transfektion konnte QED6 - 8 in der Infektion mit noch stärkerer Effizienz hemmen. Ref1 und QED6 - 8 waren bei 1 µM nahezu gleich effizient und hemmten die CDV-induzierte Zellfusion zu ca. 60 %. Hingegen vermochten QED15B - 12, QED6 - 8 und QED15A - 12 die Synzytienbildung bei Verwendung von 4 µM um ca. 50 - 70 % zu reduzieren. Weiterhin ist zu bemerken, dass Ref1 bei 2 µM nicht toxisch wirkte und zu einer Inhibition von 80 % führte. Da hier kein Transfektionsreagenz wie in dem Transfektions-Assays verwendet wird, blieb die vermutlich toxische Kombination von Substanz und Transfektionsreagenz aus und führte somit zu einer höheren Verträglichkeit von Ref 1.

Abschließend kann für CDV zusammengefasst werden, dass die Substanzen QED6 - 8, QED15B - 12, QED15A - 12, Ref1 und QD2 - 3 aus der ersten Substanzgruppe in Transfektionen von CDV-F und -H exprimierenden Vektoren am besten wirkten. Nach Infektion konnten jedoch Ref1 und QED6 - 8 ähnliche Effizienz in der Synzytienhemmung zeigen und QED15B - 12 in höheren Konzentrationen eine ähnliche Inhibition induzieren. Aus der zweiten Substanzgruppe konnten GH02 und GH36 (Referenzsubstanz AS-48) als am besten wirkende Inhibitoren hervorgehen. Allerdings wurden diese nicht in Infektions-Assays getestet, da diese Substanzen im Vergleich zu Referenzsubstanz 1 (Ox-1) die Hemmung der Zell-Zellfusion nicht gleichbedeutend beeinflussen konnten.

4.2.3 Untersuchungen von Inhibitoren gegen MV

4.2.3.1 Testung der Substanzen in der transfektionsabhängigen MV-F und -H induzierten Zell-Zellfusion

Es wurden pCG-MV-H und -F exprimierende Plasmide in Vero-Zellen einer 6-well-Platte mit PEI transfiziert und gleichzeitig zwischen 0,5 μM und 20 μM der Substanzen aus der ersten und zweiten Gruppe nach Zugabe der Transfektionsmises beigefügt. Der Gesamtansatz wurde $\ddot{U}\text{N}$ für 20 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Zellen wiederum mit 4 % PFA fixiert und die Zell-Zellfusion in fünf verschiedenen Stellen des Napfes analysiert. Die Versuche wurden für jede Substanzgruppe drei Mal wiederholt und der Mittelwert gebildet. Schließlich wurden alle Werte im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet, die Standardabweichung bestimmt und in Diagrammen ausgewertet (siehe Abbildung 4.2.3.1.1 und 4.2.3.1.2).

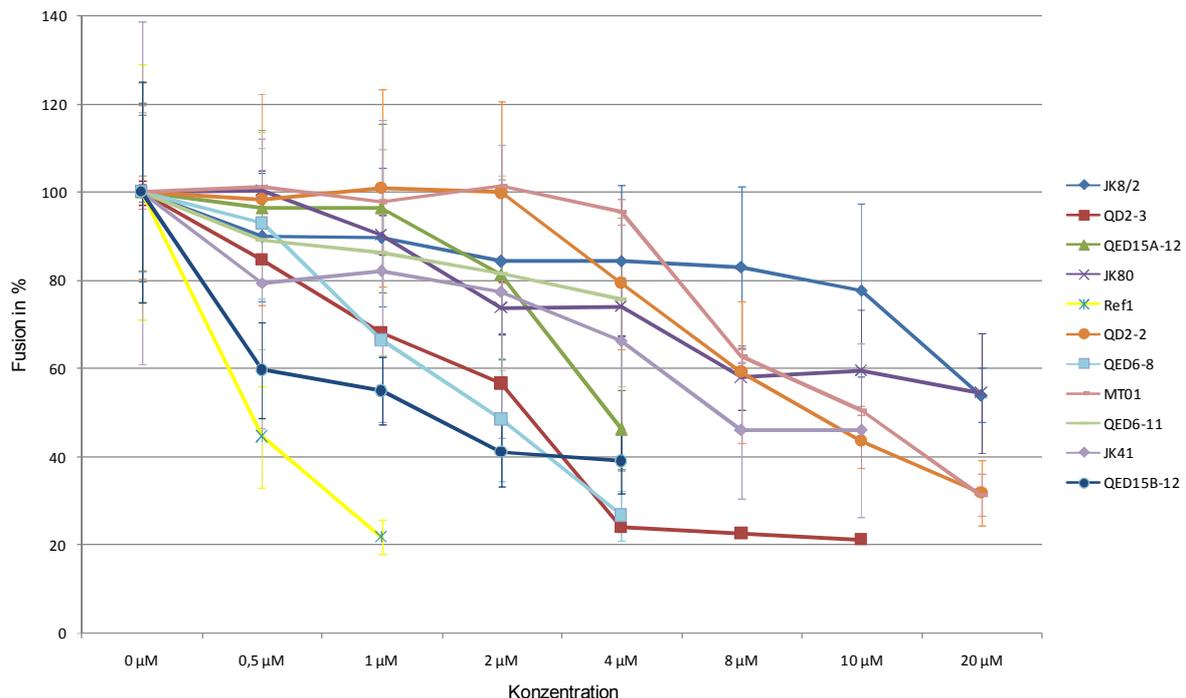


Abbildung 4.2.3.1.1: Dosisabhängige Testung verschiedener Substanzen auf Vero-Zellen, die mit pCG-MV-F und -H transfiziert und in Konzentrationen von 0 μM - 20 μM für 20 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurden. Die Reduktion der Zellfusion, die durch das Ermitteln der Synzytiengröße (Zählen der Nuklei pro Synzytium in 5 verschiedenen Bereichen des Präparats) beurteilt werden konnte, diente dabei als Maß für die Wirkung der Inhibitoren. Die Werte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

In Abbildung 4.2.3.1.1 konnte beobachtet werden, dass die Substanz Ref1, wie auch schon veröffentlicht (Plemper et al., 2004), die Synzytienbildung von MV nach Transfektion in niedrigen Konzentrationen von 0,5 μM - 1 μM sehr stark hemmt. Allerdings war Ref1 auch hier in höheren Konzentrationen sehr zelltoxisch, so dass hier keine weiteren Dosen getestet werden konnten, was wohl wiederum vermutlich an der Kombination aus Transfektionsreagenz und Substanz lag, die beide unabhängig voneinander nicht toxisch waren. Während die Zellfusion mit Ref1 bei 1 μM um ca. 80 % gehemmt wurde, konnte dies nur durch die Verwendung von höheren Konzentrationen von 4 μM QD2-3 und QED6-8 in ähnlichem Maße erreicht werden. QED15-B12 und QED15A-12 konnten die Synzytienbildung von 100 % in der Kontrolle auf nahezu 40-45 % unter Verwendung von Konzentrationen von 4 μM senken. Andere Substanzen zeigten nur bei sehr hohen Dosen eine Wirkung auf die Zell-Zellfusion (QD2-2, MT01) und wurden daher nicht in späteren Infektions-Assays untersucht.

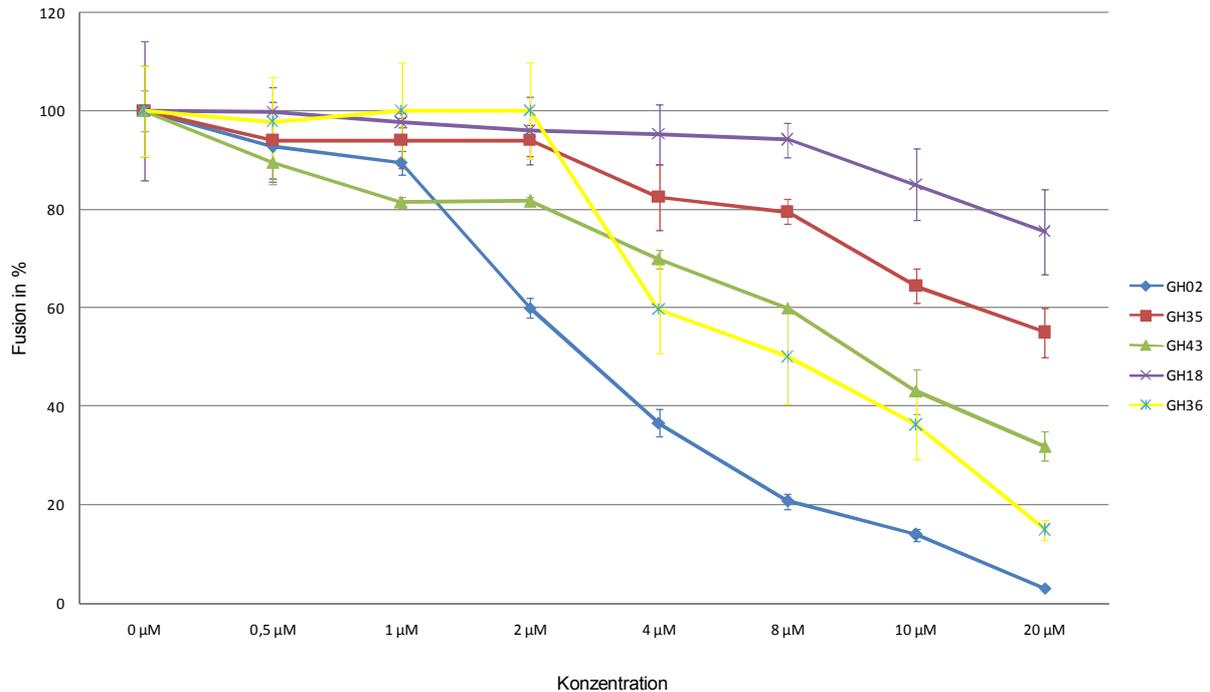


Abbildung 4.2.3.1.2: Dosisabhängige Testung verschiedener Substanzen auf Vero-Zellen, die mit pCG-MV-F und -H transfiziert und in Konzentrationen von 0 µM - 20 µM für 20 h bei 37 °C inkubiert wurden. Die Reduktion der Zellfusion, die durch das Ermitteln der Synzytiengröße (Zählen der Nuklei pro Synzytium in 5 verschiedenen Bereichen des Präparats) beurteilt werden konnte, diente dabei als Maß für die Wirkung der Inhibitoren. Die Werte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

Betrachtet man die Dosisabhängigkeitskurve der GH-Substanzen in Abbildung 4.2.3.1.2, ist wiederum zu sehen, dass die für MV veröffentlichte Substanz GH36 die nach der MV-Transfektion gebildeten Synzytium um über 80 % hemmt. Interessanterweise konnte zusätzlich festgestellt werden, dass die Substanz GH02 wesentlich besser inhibierte als GH36, nämlich mit einer Effizienz von über 90 %. Zusätzlich konnte bei GH43 ebenfalls eine Reduktion der Zellfusion auf unter 40 % beobachtet werden. Da die GH-Substanzen sehr verträglich für die verwendeten Vero-Zellen sind, konnte der Effekt direkt mit der Inhibitionseffizienz der Hemmstoffe in Verbindung gebracht werden. Allerdings zeigte sich auch hier wieder im Vergleich zur bereits veröffentlichten Verbindung Ox-1, dass die GH-Substanzen nicht annähernd so gute Hemmung der MV-induzierten Zellfusion wie die Referenz zeigten.

4.2.3.2 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung potentieller Inhibitoren in der transfektionsabhängigen MV-F und -H induzierten Zell-Zellfusion

Im Anschluss an die Transfektions-Assays und die Bestimmung der Synzytiengrößen wurden die bereits fixierten Vero-Zellen permeabilisiert und in einer Immunfluoreszenz gefärbt. Dabei wurde SSPE-Hyperimmunserum (1 : 6.000) gegen MV sowie DAPI (1 : 300) für die Färbung der Nuklei eingesetzt. Danach wurde ein Alexa 488-gekoppelter Zweitantikörper (1 : 200) verwendet. Die einzelnen Näpfe konnten anschließend am Fluoreszenzmikroskop untersucht, analysiert und fotografiert werden (siehe Abbildung 4.2.3.2.1). Dabei werden hier nur Bilder der am besten hemmenden Substanzen gezeigt, während die nicht inhibierenden Substanzen den Kontrollzellen in Abbildung 4.2.3.2.1 (B) sehr ähnelten.

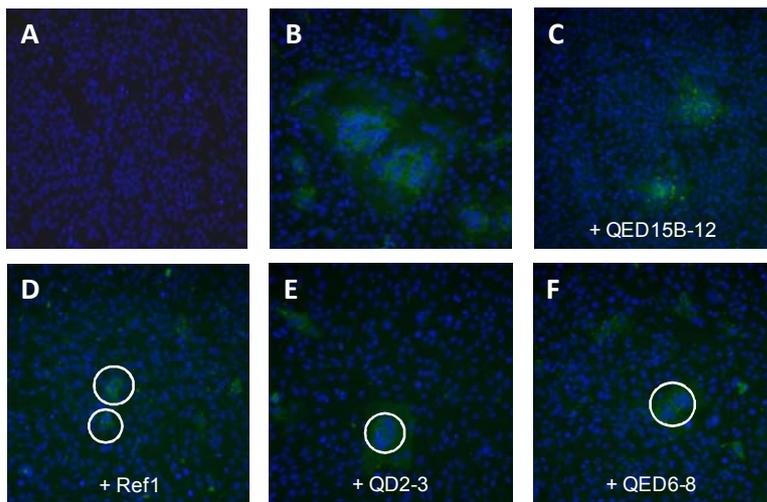


Abbildung 4.2.3.2.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Synzytienbildung mit und ohne Inhibitoren. Vero-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für MV-F und -H transfiziert (B) und anschließend in einer Immunfluoreszenz mit SSPE-Hyperimmunsereum (1 : 6.000) und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt. Die Inhibitoren wurden direkt nach Transfektion für 20 h bei 37°C zugegeben. (A) Unbehandelte Kontrollzellen; Nuklei wurden mit DAPI (1 : 300) gefärbt. (B) Kontrollzellen ohne Inhibitor. (C - F) Zellen mit 4 µM QED15B - 12, QD2 - 3, QED6 - 8 und 1 µM Ref1; Kreise: Vergleich der Synzytien in Ref1, QED6 - 8 und QD2 - 3 behandelten Zellen; (Fluoreszenzmikroskop, 10fache Vergrößerung).

In Abbildung 4.2.3.2.1 wird die Wirkung verschiedener potentieller Inhibitoren der MV-Transfektion gezeigt. Dabei ist zu erkennen, dass die Synzytiengröße von Ref1-behandelten Zellen (D) der von QD2 - 3 (E) und QED6 - 8 behandelten (F) sehr ähnlich ist. Bei allen drei Inhibitoren liegt die Hemmung der Zellfusion bei ca. 80 % im Vergleich zu den Kontrollzellen ohne Inhibitor (B). Betrachtet man die Zellfusion der mit QED15B - 12 (C) inkubierten Zellen, ist ersichtlich, dass im Vergleich zur Kontrolle (B) auch hier eine Reduktion stattgefunden hat. Dies korreliert mit den Daten, die bereits in den Graphen der dosisabhängigen Testung der Substanzen ermittelt wurden.

Letztlich wurden auch für MV die mit GH-Substanzen behandelten Zellen für die Immunfluoreszenz, wie oben beschrieben, vorbereitet. Dabei zeigt Abbildung 4.2.3.2.2 die am besten hemmenden Substanzen.

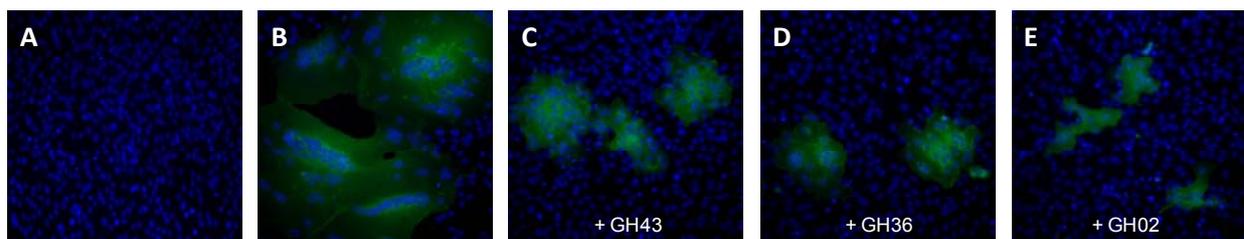


Abbildung 4.2.3.2.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Synzytienbildung mit und ohne Inhibitoren. Vero-Zellen wurden mit den Expressionsvektoren für MV-F und -H transfiziert (B) und anschließend in einer Immunfluoreszenz mit SSPE-Hyperimmunsereum (1 : 6.000) und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper gefärbt. Die Inhibitoren wurden direkt nach Transfektion für 20 h bei 37°C zugegeben. (A) Unbehandelte Kontrollzellen; Nuklei wurden mit DAPI (1 : 300) gefärbt. (B) Kontrollzellen ohne Inhibitor. (C - E) Zellen mit 8 µM GH43, GH02 und GH36. (Fluoreszenzmikroskop, 10fache Vergrößerung).

Im Vergleich zu Kontrollzellen, die nicht mit Inhibitoren behandelt wurden (B), kann man von (C) nach (E) eine deutliche Abnahme der durch pCG-MV-F und -H induzierten Zellfusion sehen, je nachdem, welcher der Inhibitoren verwendet wurde. Mit 8 µM der Substanz GH43 konnten ein wenig mehr als halb so große Synzytien wie in (B) beobachtet werden. Dies korrelierte mit den Daten, die durch den Dosisabhängigkeitstest

erhalten werden konnten. Hingegen werden die Synzytien unter Verwendung von GH36 immer kleiner (D), bis sie in (E) dann unter Verwendung von 8 μM GH02 ihre Größe um etwa 80 % verringert haben. Auch hier konnten die zuvor erhaltenen Daten aus dem Diagramm in Abbildung 4.2.3.1.2 bestätigt werden. Allerdings ist die Hemmung der GH-Substanzen nicht mit der von Ref 1 vergleichbar, die bereits bei 1 μM eine Hemmung von knapp 80 % zeigte.

4.2.3.3 Testung der Inhibitoren in der MV-Infektion

Nachdem die potentiell wirkenden Inhibitoren in den Transfektionsansätzen ermittelt und vorgetestet worden waren, konnten diese nun in der Infektion getestet werden. Wie die Experimente der CDV-Infektion im Vergleich zu den Transfektions-Assays mit pCH-CDV-F und -H gezeigt hatten (siehe Abbildung 4.2.3.3.1 und 4.2.3.3.2), konnte es durchaus möglich sein, Unterschiede im Verhalten und der Wirkungsweise der Substanzen festzustellen. Daher wurden Vero-Zellen in einer 6-well-Platte mit einer MOI = 1 mit MV-Edm infiziert und ÜN für 20 h mit und ohne Inhibitoren in Konzentrationen von bis zu 4 μM inkubiert. Anschließend wurden sie fixiert und für die Erstellung einer dosisabhängigen Inhibitorkurve die Zellfusion in jedem Napf in fünf verschiedenen Bereichen gezählt. Die Experimente wurden für jeden Wert in drei unabhängigen Versuchen wiederholt und die Mittelwerte sowie die Standardabweichung gebildet. Schließlich wurden die Werte im Verhältnis zur Kontrolle in Prozente umgerechnet und in einer Graphik dargestellt (siehe Abbildung 4.2.3.3.1).

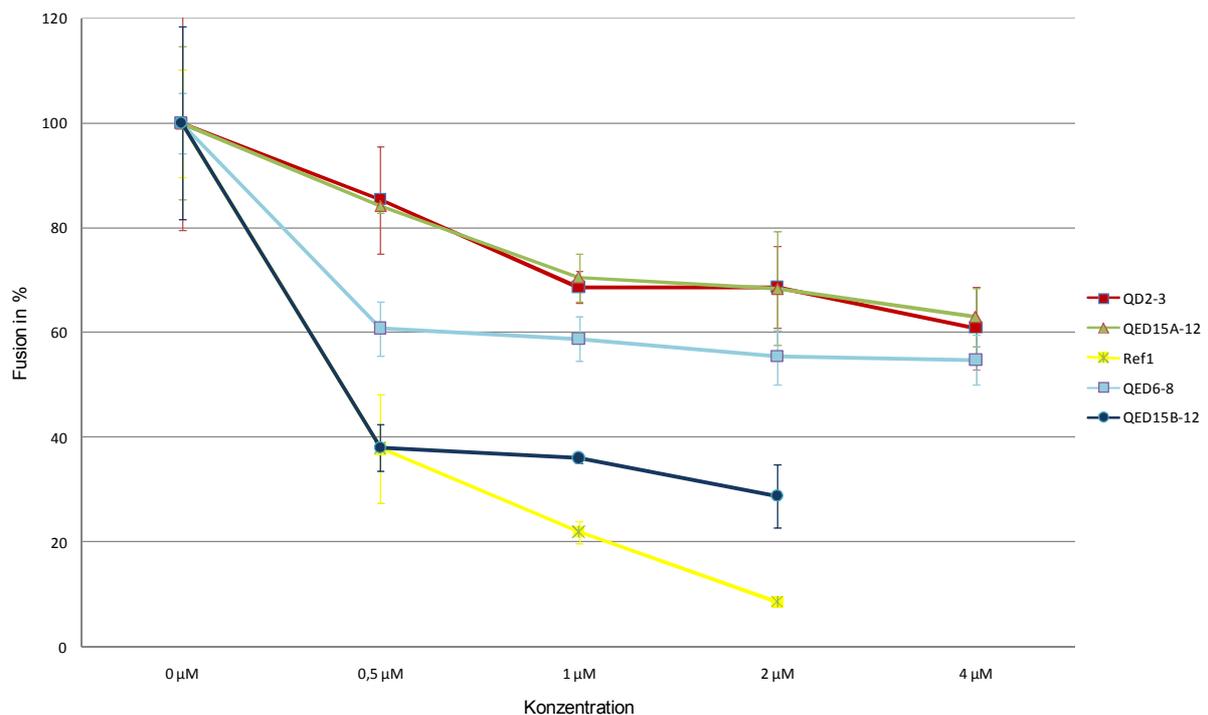


Abbildung 4.2.3.3.1: Dosisabhängige Testung verschiedener Inhibitoren auf Vero-Zellen, die mit MV-Edm infiziert wurden (MOI = 1) und mit 0 μM - 4 μM potentieller inhibitorischer Substanzen für 20 h bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zellfusion diente dabei als Maß für die Wirkung der Inhibitoren. Die Werte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

Abbildung 4.2.3.3.1 zeigt, dass Referenzsubstanz 1 in der Konzentration von 1 μM die am stärksten inhibierende Substanz ist. Während QD2 - 3 und QED15A - 12 die Zellfusion bei 4 μM von 100 % auf ca. 60 % herabsetzen konnten, verursacht QED15 - B12 bei 2 μM eine Hemmung von etwa 80 %, so wie dies auch bei Referenz 1 in niedrigeren Konzentrationen zu beobachten war. Ref1 war in Konzentrationen von bis zu 2 μM atoxisch für die Zellen. Eine Toxizität konnte nun auch für die Substanz QED15 - B12 in einer Konzentration von 4 μM beobachtet werden, bei der es nicht mehr möglich war, intakte Stellen eines Zellrasens zu entdecken.

Dies war in Transfektionsversuchen bisher nicht eingetreten. Eine vermutliche Erklärung könnte sein, dass die Kombination der Substanz, des Gesamtgehalts des DMSO und des Transfektionreagenzes zusammen für die Toxizität von Ref1 in Transfektions-Assays verantwortlich ist. Da in Infektions-Assays kein Transfektionsreagenz verwendet wird, ist die Toxizität hier herabgesetzt. Warum sich die Toxizität von QED15B - 12 allerdings erhöhte, blieb ungeklärt.

Des Weiteren wurde die Infektion mit MV-WT (IC323) getestet, um eventuelle Unterschiede in der Auswirkung der Inhibitoren auf die Synzytienbildung zu sehen. Dabei wurden die Kulturzellen auf 6-well-Platten in gleicher Weise behandelt, wie dies für die Infektion von MV-Edm beschrieben wurde. In Abbildung 4.2.3.3.2 sind die Mittelwerte aus drei voneinander unabhängigen Versuchen dargestellt und ins Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet worden. Zusätzlich wurde die Standardabweichung bestimmt.

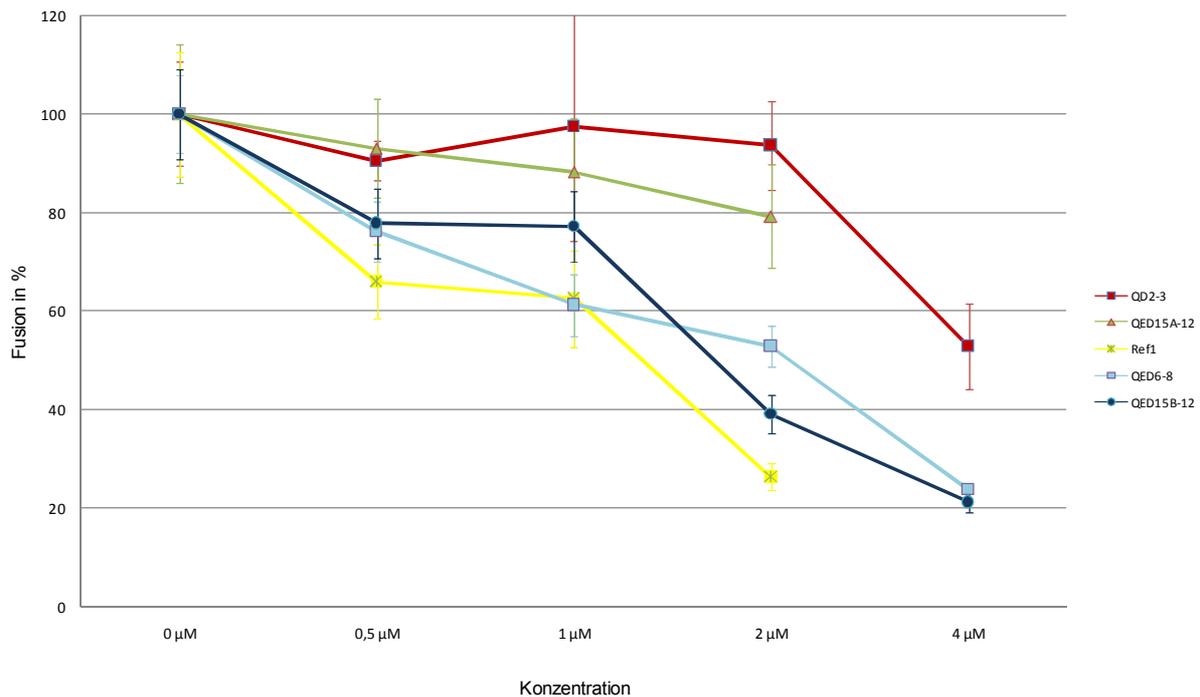


Abbildung 4.2.3.3.2: Dosisabhängige Testung verschiedener Inhibitoren auf Vero-Zellen, die mit MV-WT (IC323) infiziert wurden (MOI = 1) und mit Konzentrationen von 0 µM - 4 µM für 20 h bei 37 °C inkubiert wurden. Die Zellfusion diente dabei als Maß für die Wirkung der Inhibitoren. Die Werte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

In Abbildung 4.2.3.3.2 ist erneut zu erkennen, dass Referenzsubstanz 1 mit etwa 80 % am besten gehemmt hat. Weiterhin konnte überraschenderweise festgestellt werden, dass die Substanz in diesen Ansätzen in einer Konzentration von 2 µM nicht toxisch wirkte. Hingegen konnten Konzentrationen von 4 µM bei QED15A - 12 nicht mehr untersucht werden, da diese toxisch auf die infizierten Zellen wirkten. QED6 - 8 und QED15B - 12 zeigten eine starke Hemmung der Zellfusion von ca. 80 % bei 4 µM und somit konnte ihre Wirkung, wie in den Transfektions-Assays ermittelt, bestätigt werden.

Abschließend lässt sich sagen, dass in der Infektion mit MV-Edm und MV-WT (IC323) Referenzsubstanz 1 bei 2 µM die Infektion am besten hemmen konnte. In der MV-Edm-Infektion konnte allerdings QED15B - 12 bei 4 µM noch als gut inhibierende Substanz mit ca. 70 % Hemmung hervorgehen und verbesserte sich somit im Vergleich zur Transfektionsinhibition. Weiterhin konnten die in der Infektion mit MV-WT (IC323) ermittelten Werte die Synzytienhemmung, die in den Transfektions-Assays beobachtet wurden, bestätigen. Im Vergleich verbesserte Substanz QED15B - 12 ihre Wirkung noch in der Infektion, während QD2 - 3 sowie QED15A - 12 die Hemmung der Synzytien in der MV-Infektion nicht genauso effizient bewirken konnten.

Da die GH-Substanzen keine vergleichbaren Hemmeffekte wie Referenzsubstanz 1 (Ox-1) zeigen konnten, wurden diese nicht in Infektions-Assays getestet.

4.2.4 Untersuchungen von Inhibitoren gegen NiV

4.2.4.1 Testung der Substanzen in der transfektionsabhängigen NiV-F- und -G-induzierten Zell-Zellfusion

Wie bereits beschrieben, sind gegen das Nipah-Virus weder Vakzine noch antivirale Agentien vorhanden. Um inhibitorische Substanzen gegen NiV zu testen wurden pCz-CFG5-NiV-G und -F exprimierende Vektoren, die zusätzlich eine eGFP-Sequenz im pCz-CFG5-Vektor enthalten, in Vero-Zellen einer 6-well-Platte mit PEI transfiziert. Zum Transfektionsmix wurden gleichzeitig zwischen 0,5 μM und 20 μM der zu untersuchenden Substanzen gegeben und alles $\ddot{U}\text{N}$ für 20 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert. Am nächsten Tag wurden die transfizierten Zellen mit 4 % PFA fixiert und die Zell-Zellfusion in jedem Napf analysiert. Dafür wurden an fünf verschiedenen Stellen im Präparat die Nuklei in insgesamt 20 Synzytien gezählt. Die Versuche wurden für jede Substanzgruppe drei Mal wiederholt, der Mittelwert und die Standardabweichung gebildet und alle Werte im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Die Ergebnisse sind in in folgenden Graphen dargestellt (Abbildung 4.2.4.1.1 und 4.2.4.1.2).

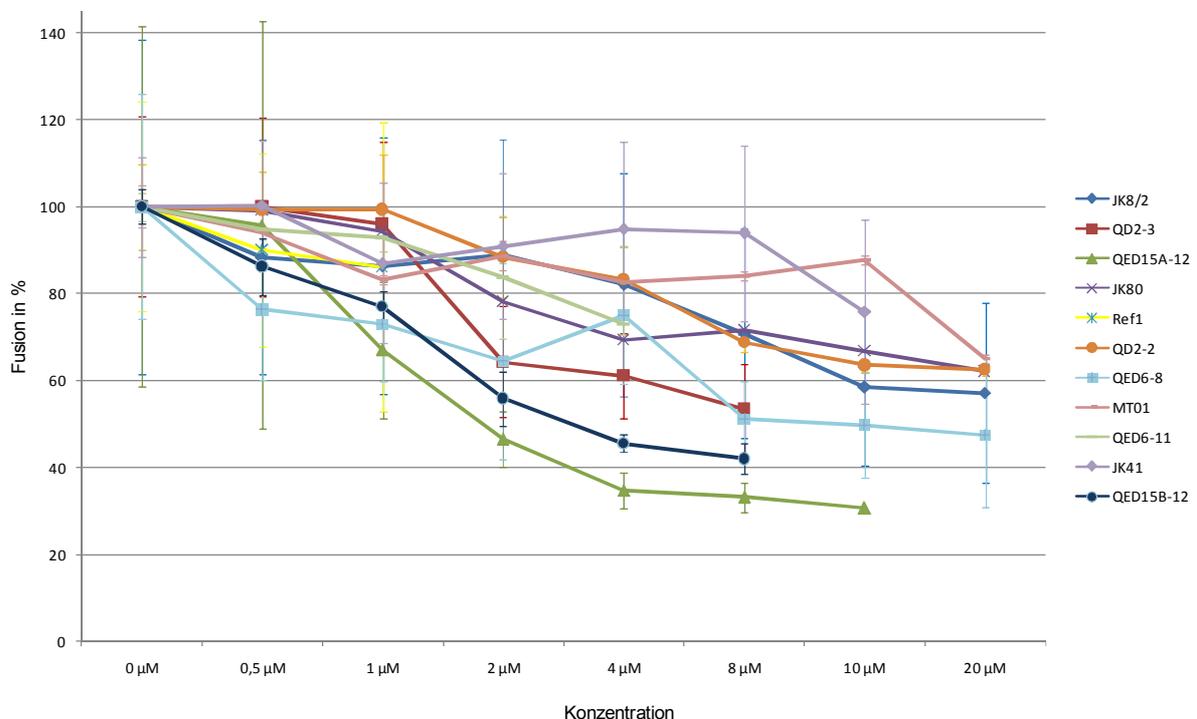


Abbildung 4.2.4.1.1: Dosisabhängige Testung verschiedener Substanzen auf Vero-Zellen, die mit pCG-NiV-F und -G transfiziert und in Konzentrationen von 0 μM - 20 μM für 20 h bei 37 $^{\circ}\text{C}$ inkubiert wurden. Die Reduktion der Zellfusion, die durch das Ermitteln der Synzytiengröße (Zählen der Nuklei pro Synzytium in 5 verschiedenen Bereichen des Präparats) beurteilt werden konnte, diente dabei als Maß für die Wirkung der Inhibitoren. Die Werte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

In der oben gezeigten Abbildung 4.2.4.1.1 konnten zwei deutlich wirkende Substanzen, QED15B - 12 und QED15A - 12, ermittelt werden, die die Zellfusion von pCz-CFG5-NiV-F und -G transfizierten Vero-Zellen zwischen 60 - 70 % hemmen konnten. Des Weiteren konnte beobachtet werden, dass Substanz Ref1, die in den bisherigen Transfektionsassays mit CDV-F/-H und MV-F/H-exprimierenden Vektoren einen sehr starken Hemmungseffekt zeigte, hier mit Konzentrationen von 0,5 μM bis 1 μM keinen Effekt auf die Zellfusion zeigen konnte. In nachfolgenden Konzentrationen war sie außerdem toxisch für die Zellen, so dass diese Ansätze nicht ausgewertet werden konnten. Weitere Substanzen wie QED6 - 8 oder QD2 - 3 konnten die Zellfusion nur bedingt hemmen.

Zusätzlich wurde wiederum die zweite zu untersuchende Substanzgruppe in einem Versuchsaufbau getestet, der dem oben beschriebenen gleich war. Hierzu wurden GH02, GH36, GH43, GH18 und GH35 in Konzentrationen von 0 μM - 20 μM eingesetzt und ÜN mit dem Transfektionsansatz inkubiert. Am darauffolgenden Tag wurden auch diese Ansätze in den 6-well-Platten fixiert und für die Zählung am Lichtmikroskop ausgewertet. Nachdem in fünf unterschiedlichen Bereichen jedes Napfes 20 Synzytien gezählt wurden, wurden nach dreimaliger, unabhängiger Wiederholung Mittelwerte und Standardabweichungen gebildet und diese in Prozent im Verhältnis zum Kontrollansatz ohne Inhibitor umgerechnet (siehe Abbildung 4.2.4.1.2).

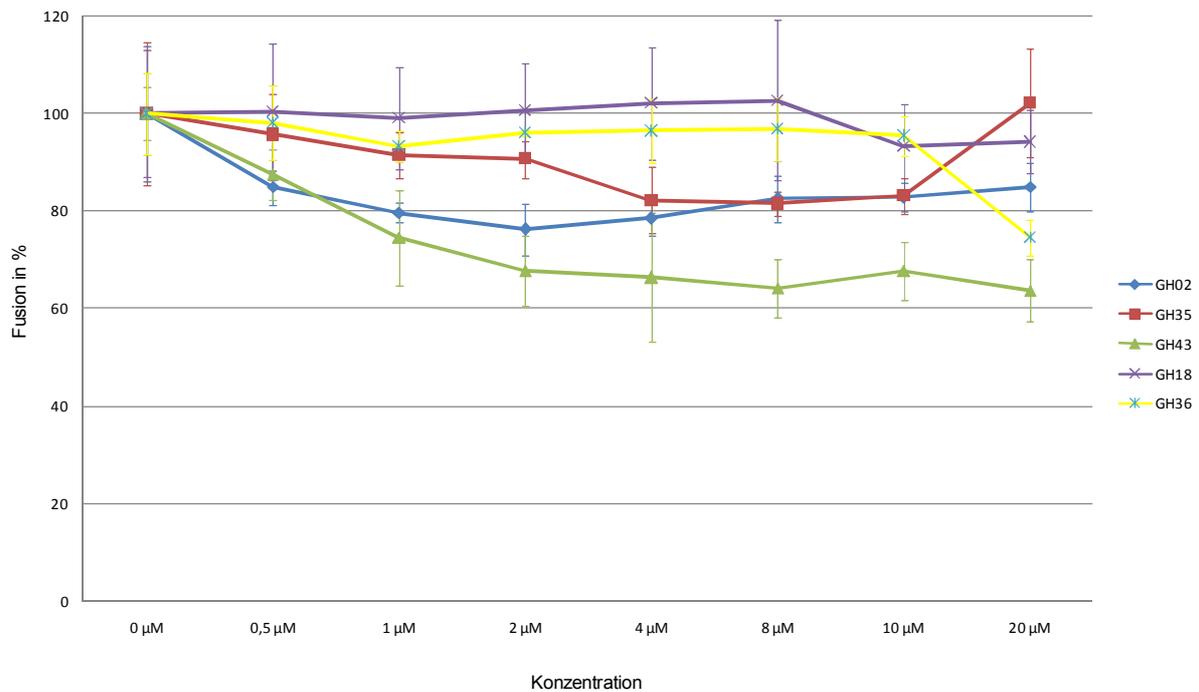


Abbildung 4.2.4.1.2: Dosisabhängige Testung auf Vero-Zellen, die mit pCz-CFG5-NiV-F und -G transfiziert und mit 0 μM - 20 μM verschiedener GH-Substanzen für 20 h bei 37 °C inkubiert wurden. Die Reduktion der Zellfusion, die durch das Ermitteln der Synzytiengröße (Zählen der Nuklei pro Synzytium in 5 verschiedenen Bereichen des Präparats) beurteilt werden konnte, diente dabei als Maß für die Wirkung der Inhibitoren. Die Werte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

In der Dosiswirkungskurve der GH-Substanzen aus Abbildung 4.2.4.1.2 ist zu erkennen, dass die Referenzsubstanz GH36 die NiV-F und -G induzierte Fusion nicht hemmen konnte. GH43 war folglich der einzige Inhibitor, der die Zellfusion um etwa 40 % reduzieren konnte. Betrachtet man die Wirkung von GH02, konnte hier keine vergleichbare Inhibition wie in den Ansätzen der pCG-MV-F/-H und pCG-CDV-F/-H induzierten Fusion von etwa 90 % beobachtet werden. GH02 zeigte demzufolge kaum eine Wirkung auf die Nipah-induzierte Zellfusion, so, wie dies auch für GH18 und GH35 zu beobachten war. Somit zeigten die GH-Substanzen keine wirkliche Hemmung auf die NiV-F und -G induzierte Synzytienbildung und wurden daher nicht in Infektions-Assays getestet.

4.2.4.2 Fluoreszenzmikroskopische Auswertung potentieller Inhibitoren in der transfektionsabhängigen NiV-F und -G induzierten Zell-Zellfusion

Nachdem die potentiell wirksamen Substanzen in Transfektions-Assays ermittelt worden waren, wurden die Ansätze in Immunfluoreszenzfärbungen weiter verarbeitet. Hierzu wurden die Zellen zusätzlich permeabilisiert und mit DAPI (1 : 300) für die Färbung der Zellkerne behandelt. Da die NiV-Vektoren eine zusätzliche eGFP-Sequenz besitzen, ist keine zusätzlich Fluoreszenzfärbung mehr notwendig (siehe Abbildung 4.2.4.2.1).

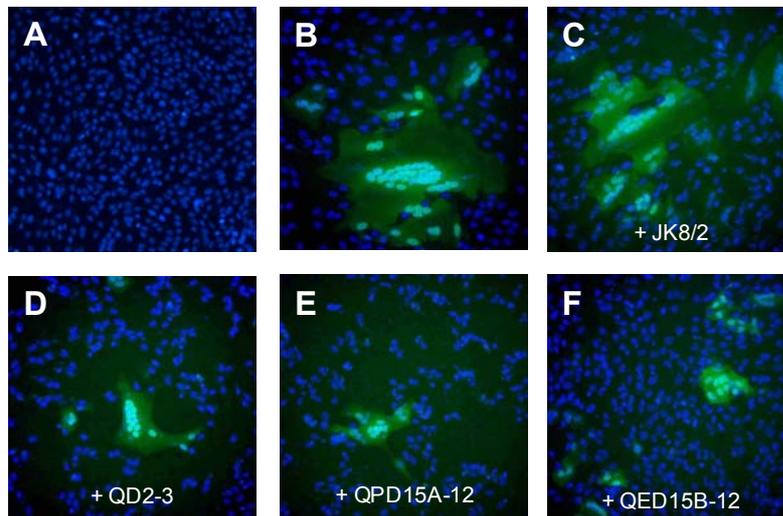


Abbildung 4.2.4.2.1:

Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Synzytienbildung mit und ohne Inhibitoren. Vero-Zellen wurden mit den pCz-eGFP-Expressionsvektoren für NiV-F und -G transfiziert (B) und anschließend mit DAPI (1 : 300) gefärbt. Die Inhibitoren wurden direkt nach Transfektion für 20 h bei 37°C zugegeben. (A) Unbehandelte Kontrollzellen; (B) Kontrollzellen ohne Inhibitor; (C - F) Zellen mit 4 µM JK8/2, QD2 - 3, QED15A - 12 und QED15B - 12; (Fluoreszenzmikroskop, 10fache Vergrößerung).

In (A) ist die Kontrolle von unbehandelten Vero-Zellen im Vergleich zu transfizierten, nicht mit Inhibitor behandelten (B) zu sehen. Hier konnten die Ergebnisse des dosisabhängigen Inhibitortests bestätigt werden, wobei Substanz QED15A - 12 am stärksten die Nipah-Fusion inhibieren konnte, gefolgt von QED15B - 12 und QD2 - 3. Die Substanz JK8/2 hingegen war in Hinsicht auf die Synzytienhemmung inaktiv(C), was im Vergleich zu (B) anhand der ähnlichen Synzytiengröße gut zu beobachten ist.

Da in den Transfektionen, in denen die GH-Substanzen verwendet wurden, kaum Hemmung beobachtet werden konnte, wurden diese zwar alle mit DAPI (1 : 300) gefärbt und ausgewertet, aber nicht in Abbildung 4.2.4.2.2 gezeigt.

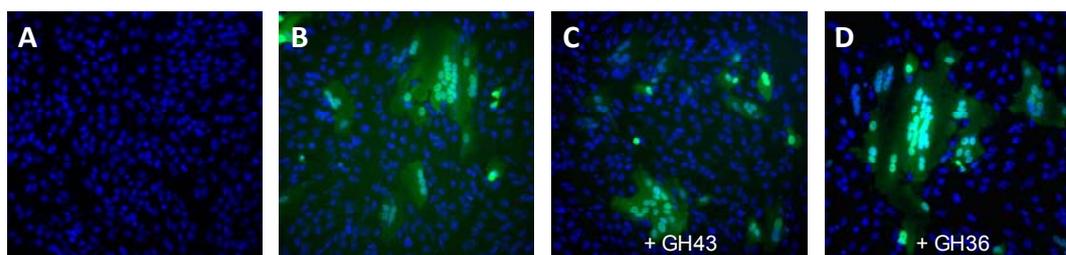


Abbildung 4.2.4.2.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der Synzytienbildung mit und ohne Inhibitoren. Vero-Zellen wurden mit den Vektoren pCz-eGFP-NiV-F und -G transfiziert (B) und anschließend in einer Immunfluoreszenz mit DAPI (1 : 300) gefärbt. Die Inhibitoren wurden direkt nach Transfektion für 20 h bei 37°C zugegeben. (A) Unbehandelte Kontrollzellen; (B) Kontrollzellen ohne Inhibitor. (C - D) Zellen mit 8 µM GH43 und GH36. (Fluoreszenzmikroskop, 10fache Vergrößerung).

Die Analyse dieser Ansätze zeigte jedoch, dass die Synzytiengröße der behandelten Zellen kaum von der der unbehandelten abwich (Abbildung 4.2.4.2.2 (B) und (D)). Nur bei GH43 konnte ein leichter Unterschied in der Zell-Zellfusion beobachtet werden. Für alle anderen nicht wirkenden Inhibitoren ist stellvertretend GH36 (D) dargestellt. Somit stimmten die Ergebnisse der dosisabhängigen Inhibitorcurve mit denen der Immunfluoreszenz überein.

4.2.4.3 Testung der Substanzen in der NiV-Infektion

Wie schon zu Anfang erwähnt, ist das Nipah-Virus als BSL-4-Erreger eingestuft. Somit mussten die nachfolgenden Versuche zur Bestätigung der Aktivität der Chinolon-Inhibitoren der ersten Substanzgruppe im BSL-4 Labor durchgeführt werden. Da ein solches am Institut für Virologie und Immunbiologie an der Universität Würzburg nicht existiert, wurden alle Versuche im BSL-4-Labor der Virologie in Marburg durchgeführt. Dafür wurden Vero-Zellen mit einer MOI = 0,2 für 20 h bei 37 °C mit und ohne Inhibitoren inkubiert. Anschließend konnten die 4-well-chamberslides, die mit 4 % PFA fixiert und permeabilisiert worden waren, außerhalb des BSL-4 Bereiches am Mikroskop ausgewertet werden. Dabei sollte die Fusionshemmungs-Aktivität, die bereits in der Transfektion bestätigt worden war, im Infektions-Assay weiter untersucht werden. Daher wurden die Synzytien in allen Näpfen in fünf verschiedenen Bereichen ausgezählt und der Mittelwert sowie die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet (siehe Abbildung 4.2.4.3.1).

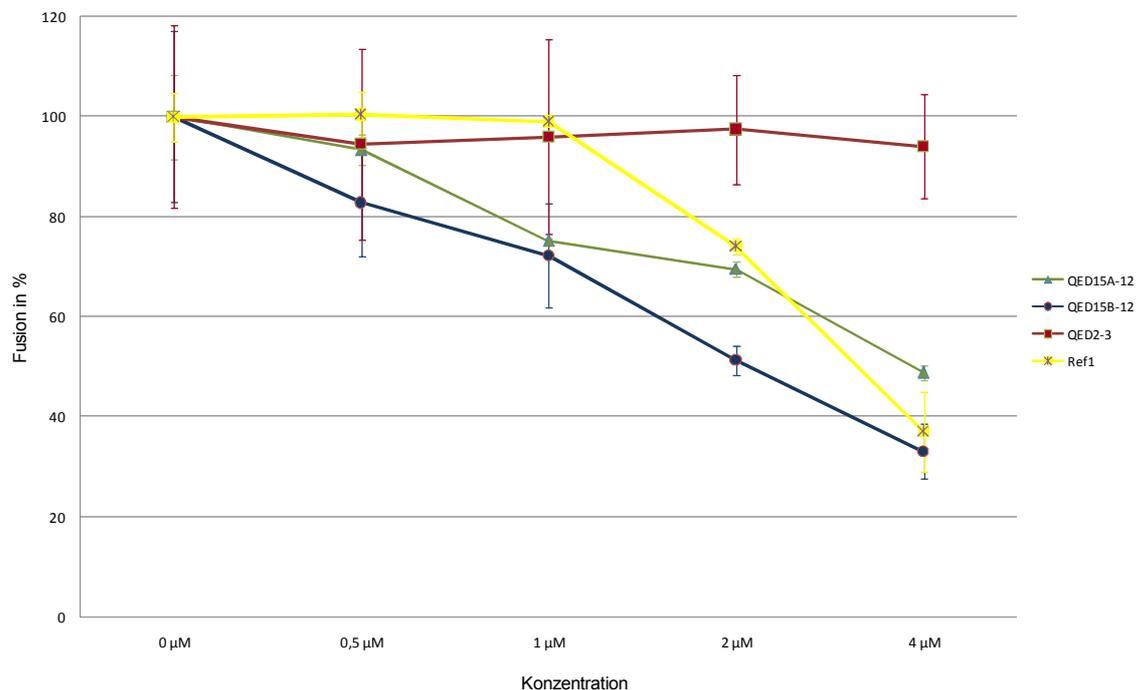


Abbildung 4.2.4.3.1: Dosisabhängiger Inhibitorstest von Vero-Zellen, die mit NiV infiziert (MOI = 0,2) und mit 0 µM - 4 µM potentieller inhibitorischer Substanzen für 20 h inkubiert wurden. Die Zellfusion diente dabei als Maß für die Wirkung der Inhibitoren. Die Werte und Standardabweichungen wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Gezeigt ist der Durchschnitt aus drei unabhängigen Versuchen.

In Konzentrationen von 0,5 µM bis 4 µM wurde die NiV-induzierte Synzytienbildung mit den Substanzen QED15B - 12, QED15A - 12, QD2 - 3 und Ref1 untersucht. Dabei konnte die Zellfusion durch QED15B - 12 und Ref1 bis zu knapp 70 % und QED15A - 12 bis zu 50% gehemmt werden. Erstaunlicherweise konnte bei der Infektion mit Referenzsubstanz 1 bei 4 µM die Synzytienbildung gehemmt werden, während dies in Transfektions-Assays mit Plasmiden, die NiV-F- und -G exprimierten, nicht beobachtet werden konnte.

Abschließend konnte gezeigt werden, dass keine der GH-Substanzen die NiV-induzierte Zell-Zellfusion hemmen konnte. Allerdings konnten aus der ersten Substanzgruppe der Chinolone zwei vielversprechende inhibitorische Verbindungen ermittelt werden: QED15B - 12 und QED15A - 12. Während diese auch schon in der Transfektion die Synzytienbildung hemmten, konnte dies ebenso für die NiV-Infektion bestätigt werden. Beide Substanzen konnten die Zell-Zellfusion effizient zwischen 50 % und knapp 70 % hemmen, wobei der IC₅₀-Wert (50 % inhibitory concentration) bei QED15B-12 bei ca. 2,1 µM lag und der für Ref 1 bei ca. 3,5 µM.

Alle in diesem Teil der Doktorarbeit erarbeiteten Ergebnisse wurden im Journal of Medicinal Chemistry zur Veröffentlichung eingereicht (Niedermeier S. und Singethan K. et al., 2008; zur Veröffentlichung eingereicht).

4.3 Etablierung eines Inhibitor-Testsystems für die Dengue-Virusaufnahme

4.3.1 Klonierung des Dengue E-Proteins aus pMT-DV2-4 in den pCG-Vektor

Ein Ziel dieser Doktorarbeit war die Verwendung von DENV E-Protein exprimierenden Vektoren für die Herstellung pseudotypisierte retroviraler Partikel, um kleine inhibitorische Moleküle gegen das Oberflächenprotein zu testen. Dazu konnten die Plasmide pMT-DV1/5', pMT-DV2/5', pMT-DV3/5' und pMT-DV4/5' sowie pTOPO-DV2/3', pTOPO-DV3/3' und pTOPO-DV4/3' mit freundlicher Genehmigung von Prof. Dr. Philippe Desprès verwendet werden. Zur Vorbereitung für die bevorstehenden Versuche wurden die fehlenden 3' Enden aus den p-TOPO-Vektoren isoliert und in pMT-DV2/5', pMT-DV3/5' und pMT-DV4/5' kloniert. Nach erfolgreicher Klonierung wurde jedoch festgestellt, dass die kompletten E-Proteinsequenzen nun Mutationen in ihren Sequenzen enthielten, die durch gezielte Mutagenese korrigiert wurden. Als schließlich Vektoren, mit korrekten E-Proteinsequenzen vorlagen, sollten diese in Immunfluoreszenzfärbungen auf ihre E-Proteinexpression getestet werden. Hierzu ergab sich zu Beginn der Etablierung dieses neuen Projektes die Frage, welche Antikörper verwendet werden könnten. So wurden zahlreiche Versuche durchgeführt, bis endlich ein geeigneter Antikörper gefunden war, der eine E-Proteinfärbung gewährleisten konnte. Die durchgetesteten Antikörper, die für das Projekt untersucht wurden, sind in Tabelle 4.3.1.1 zusammengefasst. Da nun mit Hilfe des α -Denguecomplex, pan die Expression der generierten Plasmide getestet werden konnte, musste festgestellt werden, dass die Vektoren pMT-DV2 - 4 auf 293T-, Vero- und HeLa-Zellen keine E-Proteinexpression zeigten und zusätzlich nur durch CuSO_4 -Induktion in S2-Zellen möglich war, allerdings mit nicht zufriedenstellender Effizienz. Daher schien eine hohe Expressionseffizienz Voraussetzung für die Herstellung pseudotypisierter DENV-E-tragenden Partikel.

Antikörper	Firma	Färbung
Polyclonal Antibody to Dengue Virus Types 1 - 4 BP2215 (Rabbit)	Acris Antibodies	Bis zu 1 : 100.000 Hintergrundfärbung; Keine E-Proteinfärbung
Mab to Dengue Virus Pan BM946 Klon 5D2 (Maus)	Acris Antibodies	E-Proteinfärbung bei 1 : 100; nach 1 Charge nicht mehr verkäuflich
Mab anti-Dengue Complex, pan Klon 9.F.10 (Maus)	US Biological	E-Proteinfärbung bei 1 : 400; bis heute erhältlich

Tabelle 4.3.1.1: Getestete Antikörper gegen DENV.

So sollte der ausgewählte Vektor primär auch in Vero- oder 293T-Zellen exprimiert werden können, weshalb die Wahl auf den pCG-Vektor fiel. Da die carboxyterminale Region des E-Proteins mit Hilfe der Transmembranhelices des M-Proteins in der Membran verankert wird, sollte die prM-Sequenz ebenfalls in den ausgewählten Vektor integriert werden. Da die E-Proteine außerdem als metastabile Form in einem Komplex mit dem prM-Protein, das eine Art Chaperon darstellt, synthetisiert werden, ist somit das prM-Protein für die korrekte Faltung und die Verankerung des E-Proteins in der Membran verantwortlich und folglich auch für seine Funktionalität.

4.3.1.1 Entfernen der BamHI-Restriktionsschnittstelle in pMT-DV2

Um die in unserer Gruppe klonierten Plasmide pMT-DV2, pMT-DV3 und pMT-DV4, die die komplette prM+E-Sequenz enthielten, in einen expressionsstärkeren pCG-Vektor zu klonieren, konnte in allen Fällen das BamHI-Restriktionsenzym verwendet werden, um die komplette Gensequenz aus dem pMT-Vektor auszuschneiden (siehe Abbildung 4.3.1.1.1 (A)).

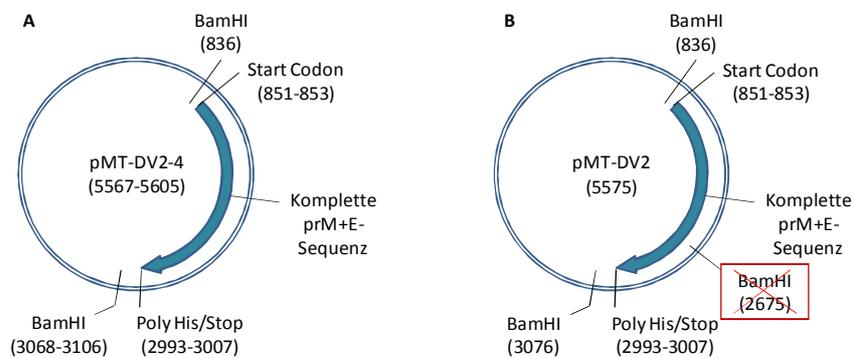


Abbildung 4.3.1.1.1: (A) pMT-Vektor mit den jeweiligen E-Proteinen von DENV 2 - 4. Die für die Klonierung zu benutzenden BamHI-Restriktionsschnittstellen liegen jeweils vor und nach der kompletten prM- und E-Sequenz. **(B)** Das pMT-DV2 Plasmid mit einer zu entfernenden BamHI-Schnittstelle an Position 2.675.

Allerdings musste zuvor in pMT-DV2 eine sich innerhalb der E-Proteinsequenz befindende zusätzliche BamHI-Schnittstelle an Position 2.675 entfernt werden (Abbildung 4.3.1.1 (B)). Die Zerstörung der Restriktionsschnittstelle erfolgte über das QuickChange II Site-Directed Mutagenesis Kit von Stratagene. Dabei wurden zuerst mutagenisierte Primer hergestellt, die die gewünschte Mutation in Form eines Basenaustausches enthielten. Dann wurde mittels PCR zuerst der Mutantenstrang synthetisiert und anhand der PfuUltra-DNA-Polymerase zum mutierten Plasmid verlängert. Durch den Verdau mit Dpn I wurden parental hemimethylierte und methylierte DNA-Stränge zerstört und nur die Mutation enthaltenden DNA-Stränge selektiert. Schließlich wurden die mutierten Moleküle in superkompetente XL1-Blue-Zellen transformiert und hochgezogen (siehe Kapitel 3.4.19). Das fertige Plasmid wurde als pMT-DV2-ΔBamHI bezeichnet und gemeinsam mit pMT-DV3 und pMT-DV4 mittels Verdau mit BamHI für die Klonierung in den pCG-Vektor vorbereitet.

4.3.1.2 Kontrolle der Entfernung der Schnittstelle mittels BamHI-Verdau

Um den Erfolg der Entfernung der BamHI-Schnittstelle an Position 2.675 zu kontrollieren, wurde die pMT-DV2-ΔBamHI Plasmid-DNA verschiedener Klone im Vergleich zu pMT-DV2 verdaut und auf einem 1 %igen Agarosegel aufgetragen (siehe Abbildung 4.3.1.2.1).

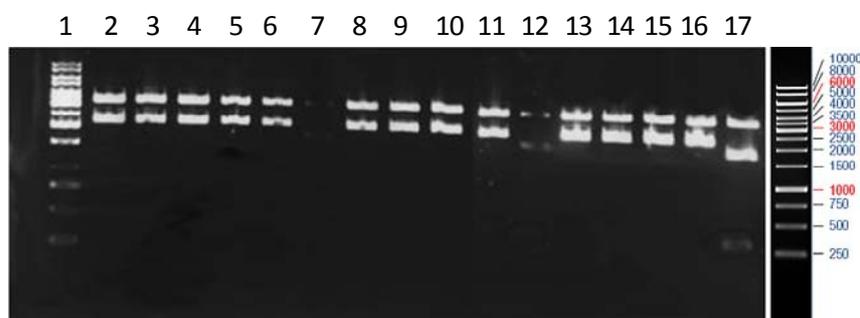


Abbildung 4.3.1.2.1: Verdau mit BamHI auf einem 1 %igen Agarosegel. Spur 1: 1 kb Marker; Spur 2 - 16: Verdau der pMT-DV2-ΔBamHI Klone 1 - 15; Spur 17: Kontrollverdau mit pMT-DV2.

Im Kontrollverdau mit pMT-DV2 ist zu erkennen (Spur 16 Abbildung 4.3.1.2.1), dass drei Fragmente entstanden sind, da sich drei BamHI-Restriktionsschnittstellen in dem Plasmid befinden. Allerdings konnte bei 13 von 15 Klonen die BamHI-Schnittstelle erfolgreich entfernt werden, so dass nach dem Verdau nur noch zwei Fragmente nachgewiesen werden konnten. Somit konnte die BamHI-Schnittstelle an Position 2.675 durch einen Basenaustausch mit Hilfe der Mutageneseprimer erfolgreich entfernt werden.

4.3.1.3 Klonierung des E-Proteins aus pMT-DV2-4 in den pCG-Vektor

Da nun alle pMT-Plasmide nur noch jeweils zwei BamHI-Restriktionsschnittstellen enthielten, konnten diese verwendet werden, um die komplette prM+E-Proteinsequenz auszuschneiden. Dies wurde in einem Verdau mit jeweils 10 µg Plasmid-DNA und 2 µl Restriktionsenzym ausgeführt und der gesamte Ansatz anschließend in eine Geltasche eines 1 %igen Agarosegels aufgetragen. Anschließend wurden die Banden mit der korrekter Größe aus dem Gel ausgeschnitten - dabei handelte es sich bei pMT-DV2 um ein 2.240 bp, bei pMT-DV3 um ein 2.232 bp und bei pMT-DV4 um ein 2.270 bp großes Fragment. Diese wurden mit Hilfe des QIAquick Gel Extraction Kit isoliert und anschließend direkt zur Klonierung weiterverwendet. Hierzu wurden sie in einem molaren Verhältnis von 1:1 bzw. 1:3 mit dem an der BamHI-Schnittstelle geöffneten und CIAP-behandelten pCG-Vektor ligiert (siehe Abbildung 4.3.1.3.1).

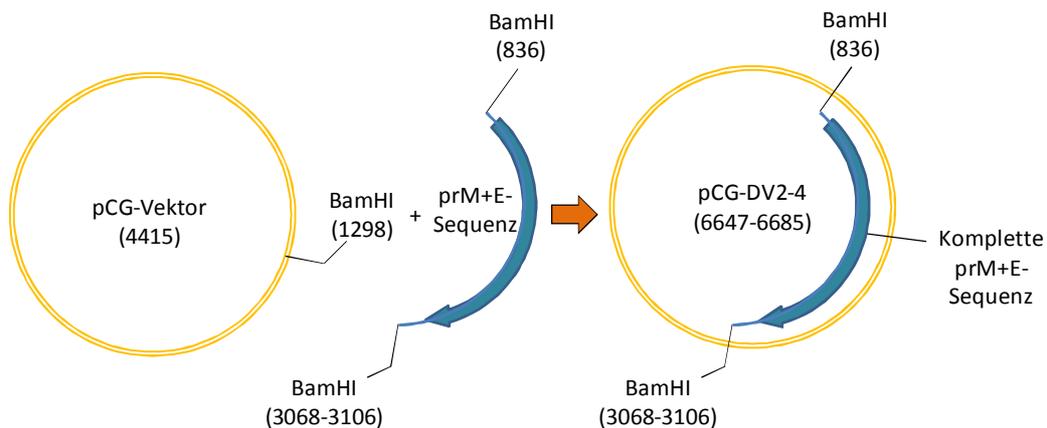


Abbildung 4.3.1.3.1: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pCG-DV2 - 4. Der mit BamHI geöffnete pCG-Vektor wurde mit dem mit BamHI ausgeschnittenen prM+E-Fragment ligiert.

Nach der Transformation in kompetente Bakterien konnten verschiedene Klone gepickt, in einer Minipräparation vermehrt und schließlich in einem Verdau mit BamHI kontrolliert werden. Die Ergebnisse der erfolgreich klonierten Plasmide pCG - DV2, pCG - DV3 und pCG - DV4 konnten in folgenden Gelen gezeigt werden (siehe Abbildung 4.3.1.3.2, 4.3.1.3.3, 4.3.1.3.4):

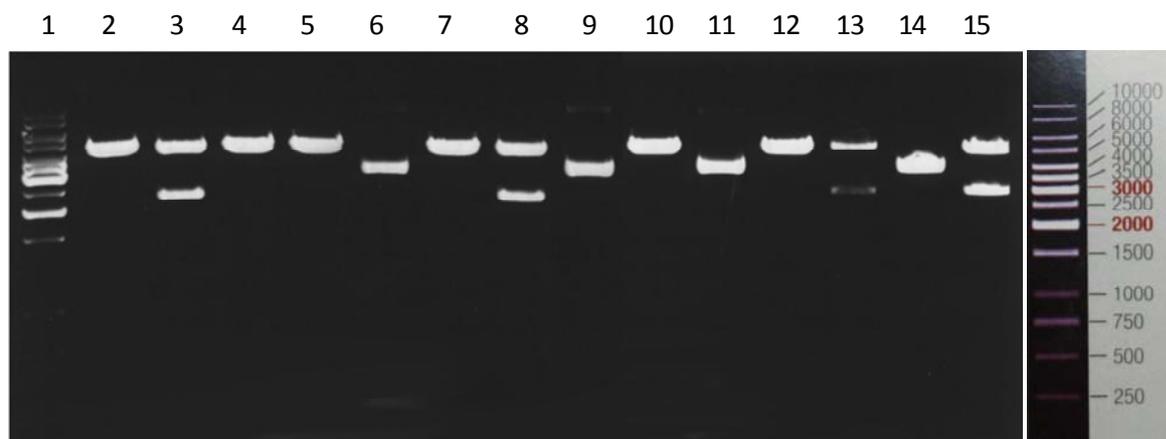


Abbildung 4.3.1.3.2: Verdau von Klon 1 - 14 in Spur 2 - 15 von pCG-DV2 mit BamHI auf einem 1 %igen Agarosegel. Spur 1: 1 kb Marker; Klon 2, 7 und 12 sind positiv und enthalten das prM+E-Fragment.

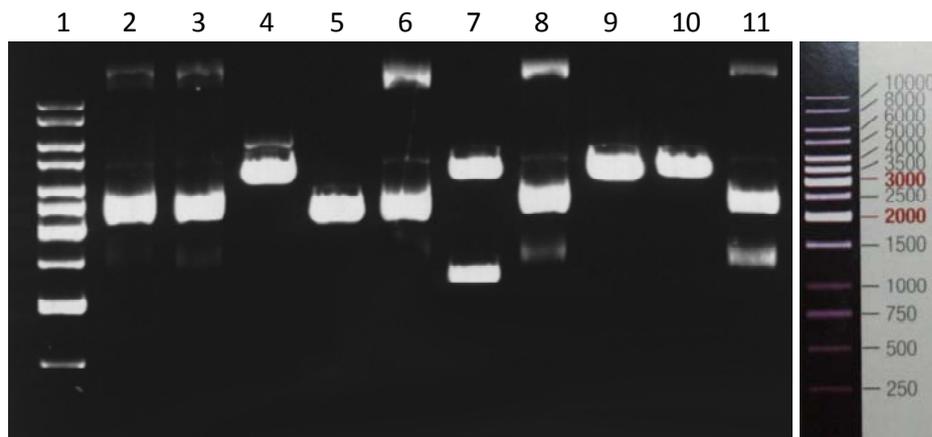


Abbildung 4.3.1.3.3: Verdau von Klon 1 - 10 in Spur 2 - 11 von pCG-DV3 mit BamHI auf einem 1 %igen Agarosegel. Spur 1: 1 kb Marker; Klon 6 ist positiv und enthält das prM+E-Fragment.

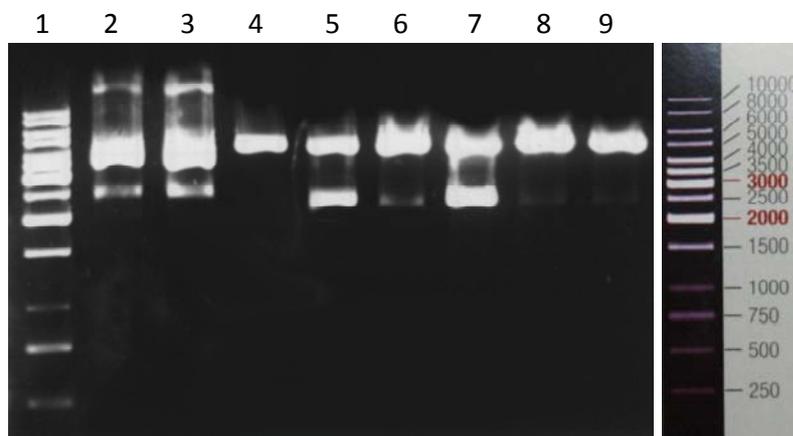


Abbildung 4.3.1.3.4: Verdau von Klon 1 - 8 in Spur 2 - 9 von pCG-DV4 mit BamHI auf einem 1 %igen Agarosegel. Spur 1: 1 kb Marker; Klon 4 und 6 sind positiv und enthalten das prM+E-Fragment.

4.3.1.4 Sequenzierung der Plasmide pCG-DV2-4

Um sicher zu gehen, dass die in den pCG-Vektor eingefügten Fragmente in richtiger Orientierung und ohne weitere Veränderungen der restlichen Sequenz inseriert hatten, wurden die ausgewählten Klone mit Hilfe von Primern, die im pCG-Vektor ansetzen und pCG-Sequenzierprimer fw und rev genannt wurden, sequenziert und kontrolliert. Dabei wurden für die jeweiligen Plasmide der in Abbildung 4.3.1.4.1, 4.3.1.4.2, und 4.3.1.4.3 gezeigte Klone ausgewählt.

pCG-DV2:



Abbildung 4.3.1.4.1: Die im Kasten markierten Sequenzen zeigen zum einen die BamHI-Schnittstelle, die zur Integration des Inserts in den pCG-Vektor verwendet wurde, sowie das Startcodon in pCG-DV2 Klon 13.

pCG-DV3:

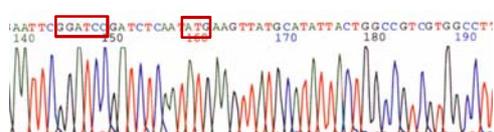


Abbildung 4.3.1.4.2: Die im Kasten markierten Sequenzen zeigen zum einen die BamHI-Schnittstelle, die zur Integration des Inserts in den pCG-Vektor verwendet wurde, sowie das Startcodon in pCG-DV3 Klon 6.

pCG-DV4:

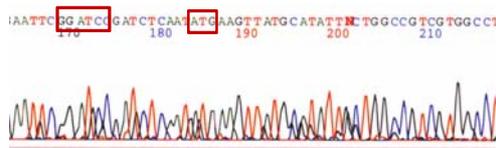


Abbildung 4.3.1.4.3: Die im Kasten markierten Sequenzen zeigen zum einen die BamHI-Schnittstelle, die zur Integration des Inserts in den pCG-Vektor verwendet wurde, sowie das Startcodon in pCG-DV4 Klon 4.

Natürlich wurde nicht nur die Anfangssequenz der Klone kontrolliert, sondern die komplette Fragmentsequenz sowie die beiden Insertionsstellen. Bei den ausgewählten Klonen der pCG-Vektoren DV2 - 4 stimmten die Sequenzen mit denen, die aus der Genbank für die E-Proteine von DENV 2 - 4 bekannt sind, absolut überein.

4.3.1.5 Expression des E-Proteins nach Transfektion mit pCG-DV2 - 4

Die erfolgreich ligierten Klone pCG-DV2 - 4 sollten nun auf ihre Fähigkeit der E-Protein-Expression zum einen in Vero-Zellen und zum anderen in 293T-Zellen getestet werden. Die Expression in 293T-Zellen sollte besonders deshalb getestet werden, da die Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel auf einem Testsystem basiert, das nur in dieser Zelllinie mit hoher Effizienz etabliert werden konnte. Dazu wurden die mit den Vektoren pCG-DV2 - 4 transfizierten Zellen nach ca. 20 h in einer Immunfluoreszenzfärbung mit dem Erstantikörper α -Denguecomplex pan gegen das E-Protein aller Dengue-Virus Serotypen für 1 h bei RT inkubiert, um anschließend mit dem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper ebenfalls für 1 h bei RT inkubiert zu werden (Abbildung 4.3.1.5.1).

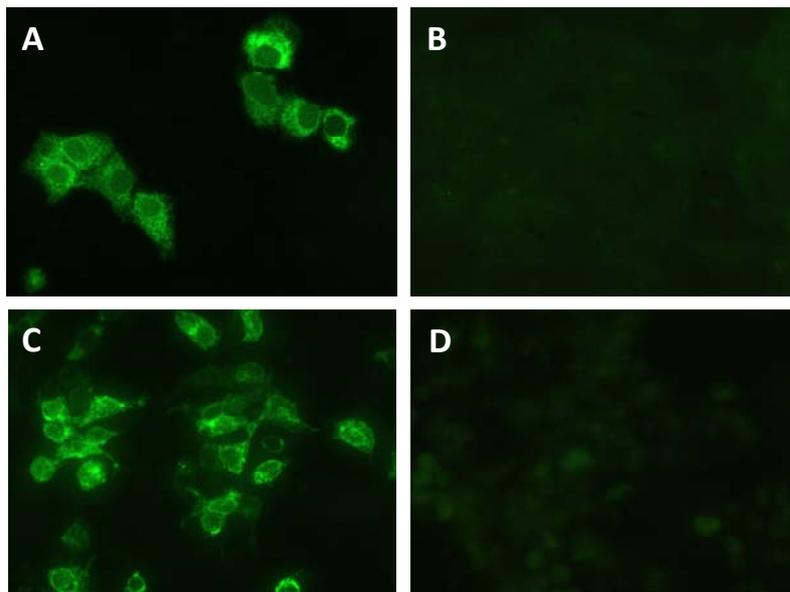


Abbildung 4.3.1.5.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen (A, B) und 293T-Zellen (C, D), die mit 1 μ g pCG-DV3 (A, C) bzw. 1 μ g pCG-DV2 und pCG-DV4 (B, D) transfiziert wurden. Die Immunfluoreszenzfärbung erfolgt mit dem primären Antikörper α -Denguecomplex, pan (1 : 400) und dem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200; grün). (Fluoreszenzmikroskop; 40fache Vergrößerung).

In Abbildung 4.3.1.5.1 ist zu sehen, dass nur unter Verwendung des pCG-DV3-Plasmids tatsächlich auch das E-Protein von DENV 3 sowohl auf Vero-Zellen (A) als auch auf 293T-Zellen (C) exprimiert wurde. Dabei akkumuliert das E-Protein in einer halbmondförmigen Sichel meist stark um den Zellkern herum. Das E-Protein von DENV 2 und 4 aus den Vektoren pCG-DV2 und pCG-DV4 konnte trotz wiederholter Klonierungsversuche und Kontrollen durch Sequenzierungen nicht zur Expression gebracht werden (B, D).

4.3.2 Versuch der Etablierung eines Testsystems zur Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel mit pCG-DV3

Da nur diejenigen Zellen das E-Protein exprimierten, die mit dem pCG-DV3-Vektor transfiziert wurden, konnte auch nur dieses Plasmid in den Ansätzen für die Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel verwendet werden. So wurden als Kontrollansätze neben den für die Herstellung retroviraler Partikel essentiellen Plasmiden pHIT60 und pczCFG2-fEYFPf mit pczVSV-G oder in Kombination mit den Plasmide pCG-H5 und pCG-F1 gemeinsam mit FIP (300 µg/ml) verwendet (siehe auch Kapitel 3.2.10). Die verschiedenen Ansätze wurden nach der eingehaltenen Versuchsdauer in einer Titration ausgewertet, wobei die Ansätze mit VSV-G in Zehnerschritten von 10^{-1} bis 10^{-10} und alle anderen in Fünferschritten von 1 : 5 bis 1 : 390.625 durchgeführt wurden. Es entstanden zum einen pseudotypisierte retrovirale Partikel mit dem G-Protein von VSV in einer Verdünnung von bis zu 10^{-8} und zum anderen H- und F-tragende Partikel in einer Verdünnung von bis zu 1 : 3.125 (siehe Abbildung 4.3.2.1 (B) und (C)). Bei dem Ansatz, in dem pCG-DV3 als Plasmid, das das prM+E-Oberflächenprotein exprimiert, verwendet wurde, konnte in den seltensten Fällen (etwa bei 1 von 5 Versuchen) die Färbung einiger weniger Zellen bei einer Verdünnung von bis zu 1 : 5 beobachtet werden (A). Auch durch Variation der Menge der DNA und des Transfektionsreagenz konnten keine besseren Ergebnisse erzielt werden. Zusätzlich wurden die Ausgangsplasmide pMT-DV2 - 4 ebenfalls in einzelnen Ansätzen zur Bildung pseudotypisierter viraler Partikel verwendet und in einer Titration ausgewertet (D, E, F). Dabei konnten in Verdünnungen von 1 : 5 bis 1 : 25 in wenigen Fällen pseudotypisierte Partikel beobachtet werden, obwohl weder auf 293T- noch auf Vero-Zellen die E-Proteinexpression nachgewiesen werden konnte (siehe Abbildung 4.3.2.2 (A)).

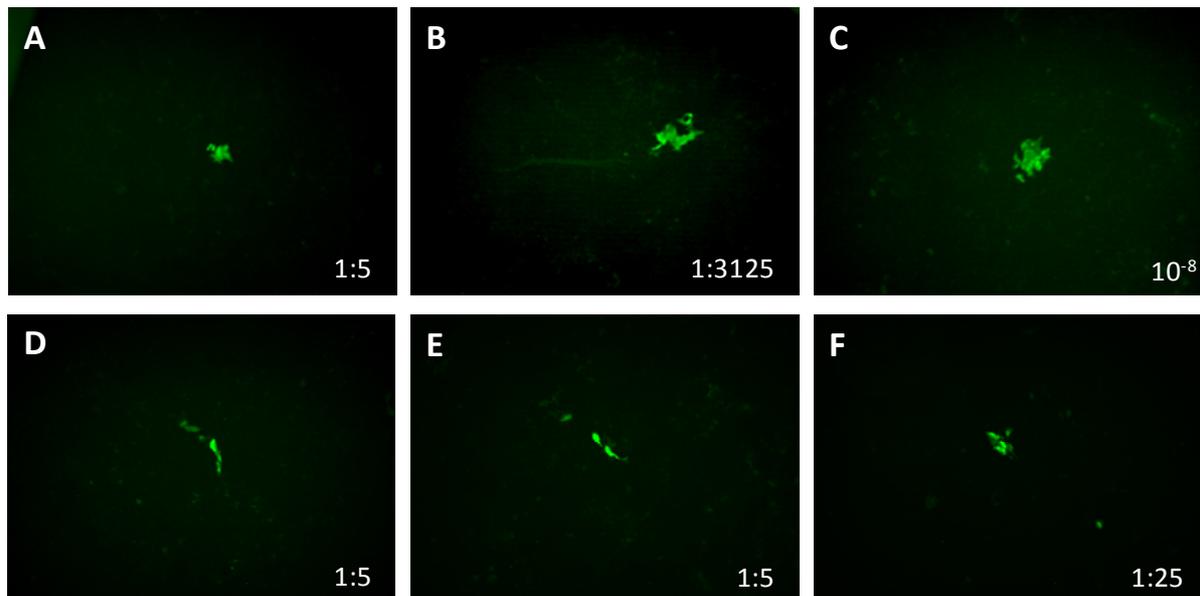


Abbildung 4.3.2.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellen, die mit 2 µg pHIT60, 2 µg pczCFG2-fEYFPf und jeweils (A) 2 µg pCG-DV3, (B) 1 µg pCG-H5 und 1 µg pCG-F1, (C) 2 µg pczVSV-G, (D) 2 µg pMT-DV2, (E) 2 µg pMT-DV3 und (F) 2 µg pMT-DV4 transfiziert wurden. (Fluoreszenzmikroskop; 10fache Vergrößerung).

Somit war die Expressionseffizienz des pCG- bzw. pMT-DV3-Plasmids sowie der anderen pCG- und pMT-DV-Vektoren nicht hoch genug, um bei der Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel ein zufriedenstellendes Ergebnis, vergleichbar mit den Kontrollansätzen, zu erreichen. Die hier erzielten Titer für das pCG-DV3-Plasmid reichten nicht aus, um ein Testsystem zur Untersuchung kleiner Inhibitormoleküle aufzustellen.

Als Kontrolle wurde nun in Immunfluoreszenzfärbungen das E-Protein transfizierter 293T-Zellen gefärbt. Diese waren zuvor mit den zur Herstellung pseudotypisierter Partikel verwendeten Vektoren transfiziert worden. Mit Hilfe des Antikörpers α -Denguecomplex, pan (1 : 400) und einem Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) konnte anschließend gezeigt werden, dass nur die Verwendung von pCG-DV3 auch tatsächlich zu E-Protein-exprimierenden 293T-Zellen führte (Abbildung 4.3.2.2 (E) und (F)). Im Gegensatz dazu konnte bei Verwendung von VSV-G ((D); Negativkontrolle) oder pMT-DV2 - 4 (A) keine E-Proteinexpression festgestellt werden. Als Positivkontrolle wurden Zellen, die mit Hilfe der Vektoren pCG-H5 und pCG-F1 transfiziert wurden, mit dem Antikörper A504 gegen MV-F (1 : 100) und anschließend mit einem Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) gefärbt (Abbildung 4.3.2.2 (B) und (C)). So konnte beobachtet werden, dass die 293T-Zellen sehr gut mit dem pCG-DV3 Plasmid transfizierbar sind und eine starke E-Proteinexpression auf den verwendeten Zellen detektierbar ist (Abbildung 4.3.2.2 (E) und in der Vergrößerung (F)), ebenso wie auf Zellen, die mit den Plasmiden pCG-H5 und pCG-F1 von MV transfiziert worden waren und eine gute F-Proteinexpression zeigten (B, C). Abschließend kann also festgehalten werden, dass das E-Protein nur ein wenig schwächer auf den Zellen detektierbar war (Vergrößerung (C)) wie die des F-Proteins von MV (Vergrößerung (F)). Trotzdem konnte nicht die gleiche Effizienz der Bildung pseudotypisierter retroviraler Partikel erreicht werden, wie in Abbildung 4.3.2.1 (B) mit pCG-MV-F- und -H-transfizierten im Vergleich mit pCG-DV3 transfizierten Zellen (A).

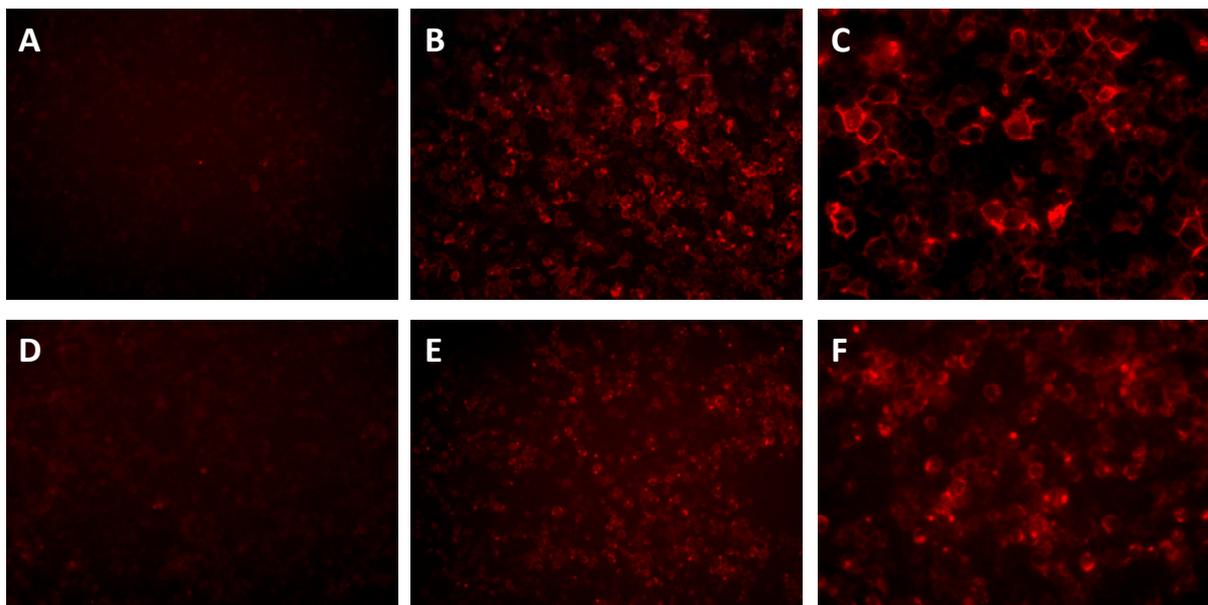


Abbildung 4.3.2.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen der E- und F-Expression auf 293T-Zellen, die mit α -Denguecomplex, pan (1 : 400) (1 : 200) (A, E, F, D) bzw. mit dem Antikörper A504 gegen MV-F (1 : 100) (B, C) und anschließend einem Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) gefärbt wurden (A - F). 293T-Zellen wurden transfiziert mit der Negativkontrolle VSV-G (A); (B) pCG-H5 und pCG-F1; Färbung des MV-F-Proteins in Übersicht und Vergrößerung (C); (D) mit pMT-DV2-4; (E) mit pCG-DV3 und Vergrößerung (F) (Fluoreszenzmikroskop; 20fache Vergrößerung (A - B, D - E) und 40fache Vergrößerung (C, F)).

4.3.3 Klonierung des E-Proteins aus pCG-DV3 in pCG-eGFP

Zur Etablierung des Testsystems mit pseudotypisierten retroviralen Partikeln sollte die Expression der sich in pCG-DV3 befindenden prM+E-Gensequenz nach der Transfektion auf der Oberfläche verschiedener Kulturzellen verbessert werden. Zusätzlich sollte als Kontrolle für die E-Proteinexpression bzw. die Funktionalität des Vektors eine Markergensequenz (eGFP) eingefügt werden. Somit waren verschiedene Klonierungsschritte vorgesehen, für die eine Strategie verfolgt wurde, bei der verschiedene Teile der prM+E-Gensequenz, wie die N-terminale (bis zur 3 AS langen zytoplasmatischen Schleife) oder C-terminale (nur die

C-terminale Transmembranregion) Region oder die gesamte Gensequenz, zur Klonierung verwendet wurden. Es sollte dadurch herausgefunden werden, mit welcher Kombination eine ideale Expression des E-Proteins möglich sein würde. Dazu wurden Primer entworfen, die am Anfang ihrer Sequenz eine zusätzliche Kozak-Konsensus-Sequenz (gccRccAUGG; R=G/A; G = austauschbar, allerdings mit leichtem Verlust der Konsensusstärke) enthielten, um die Translation des Proteins durch die Ribosomen zu verstärken. Zusätzlich enthielten sie verschiedene Restriktionsschnittstellen, die bei der Klonierung verwendet wurden.

Es wurden drei verschiedene Klonierungsansätze ausgeführt:

1. Aus dem pCG-DV3-Vektor wurde der N-terminale Teil der prM+E-Gensequenz bis zu AS 652 (ohne die AS, die die 3 AS lange zytoplasmatische Schleife und den letzten Transmembraneil des E-Proteins bilden) mit Hilfe der Primer 1 und 2A (siehe Kapitel 2.6) mittels einer PCR isoliert. Das Fragment wurde mit BamHI verdaut und durch eine Gelisolation gereinigt, um es direkt in einer 1 : 1 bis 1 : 3 Ligation ÜN mit dem an der BamHI-Stelle geöffneten pCG-eGFP-Vektor einsetzen zu können (siehe Abbildung 4.3.3.1).

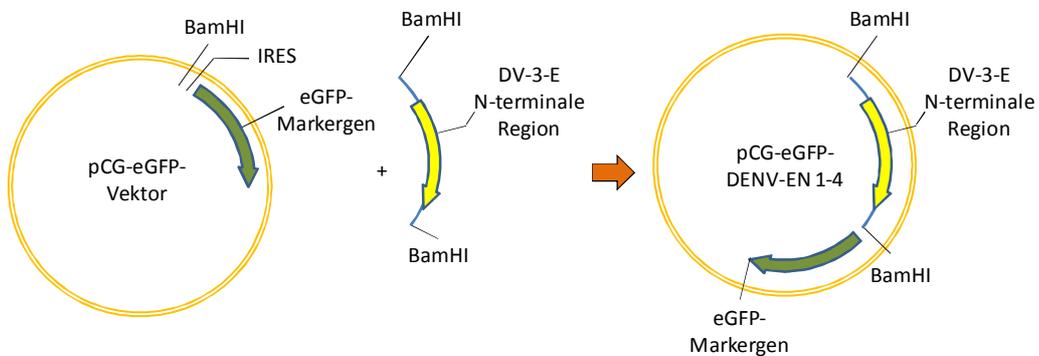


Abbildung 4.3.3.1: Klonierungsstrategie 1: Der mit BamHI geöffnete pCG-eGFP-Vektor wird mit der N-terminalen Region des E-Proteins aus pCG-DV3 ligiert.

Nach der Transformation in kompetente Bakterien wurden Kolonien gezüchtet, die auf die korrekte Orientierung der N-terminalen E-Sequenz mit Hilfe des Sequenzierprimers fw und Primer 2A in einer PCR untersucht wurden. Dabei konnte pCG-eGFP-DV3-E-N Klon 2 als Produkt mit korrekter Orientierung identifiziert werden (siehe Abbildung 4.3.3.2).

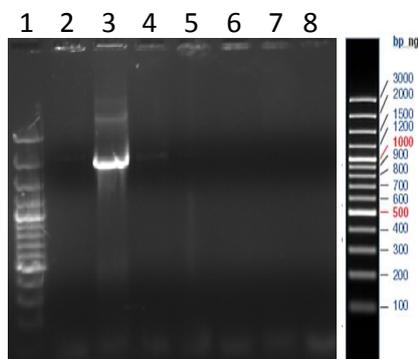


Abbildung 4.3.3.2: Gelaufnahmen der PCR-Produkte, die nach der Amplifikation mit dem Primer pCG-fw und 2A entstanden sind. Spur 2 - 8: Klone 1 - 7; Spur 1: 100 bp Marker. Spur 2 zeigt den korrekten Klon 2 von pCG-eGFP-DV3-E-N.

2. Im zweiten Klonierungsansatz wurde in 3 Teilschritten die N-terminale und C-terminale prM+E-Gensequenz aus dem pCG-DV3-Vektor sowie die zytoplasmatische Region (Carboxyterminus) von MuLV-ENV isoliert und in den pCG-eGFP-Vektor kloniert (Trilinking; siehe Abbildung 4.3.3.3).

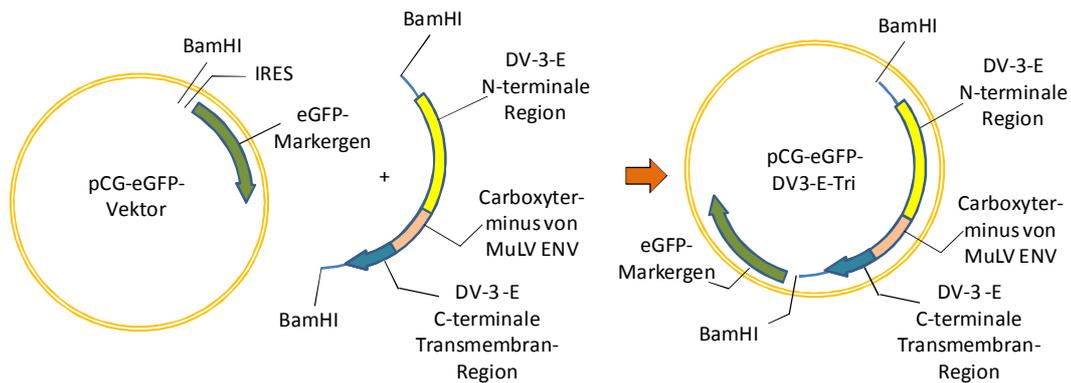


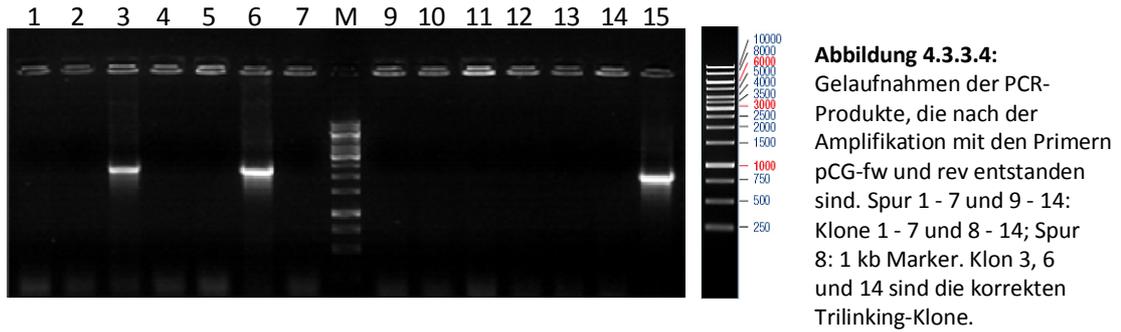
Abbildung 4.3.3.3: Klonierungsstrategie 2: Der mit BamHI geöffnete pCG-eGFP-Vektor wird mit der N-terminalen Region des E-Proteins aus pCG - DV3, der zytoplasmatischen Region (Carboxyterminus) von MuLV ENV aus pcsi-MEA und der C-terminalen Region des E-Proteins aus pCG - DV3 ligiert.

Für diese drei Ligationsschritte wurde ein pDSRed 2-C1-Vektor als Zwischenvektor verwendet. Zuerst wurde der C-terminale Teil der prM+E-Gensequenz mit Hilfe der Primer 5 und 6 (siehe Kapitel 2.6) aus dem pCG-DV3-Vektor amplifiziert. Dabei startet Primer 5 erst bei AS 656, so dass tatsächlich nur die C-terminale Region der prM+E-Gensequenz isoliert und durch eine Gelaufreinigung gereinigt wurde. Im Anschluss wurde der pDSRed 2-C1-Vektor mit Hilfe von Sac II und BamHI geöffnet sowie der C-terminale Part der prM+E-Gensequenz mit denselben Restriktionsenzymen für die 1 : 1 bzw. 1 : 3 Ligation ÜN vorbereitet. Nach der Ligation konnten durch Transformation Kolonien gezogen werden, diese mit Hilfe der pDSRed-seq-fw und -rev Primer auf ihre korrekte Orientierung und Sequenz untersucht und schließlich Klon 12 identifiziert werden.

In einem zweiten Schritt wurde der Carboxyterminus des murinen Leukemie-Virus aus dem Vektor pcsi MEA mit Primer 3 und 4 (siehe Kapitel 2.6) isoliert. Da das ursprüngliche E-Protein von Dengue nur eine aus 3 AS bestehende kurze, zytoplasmatische Schleife besitzt, bestand die Hypothese, dass eventuell durch die Zugabe einer zytoplasmatischen Region des MuLV-ENV-Gens, die Verpackung des E-Proteins verbessert werden könnte. Daher wurde nach der Isolation mittels PCR und einer Gelaufreinigung die zytoplasmatische Region für die Klonierung mit Hilfe eines Verdaus mit Kpn I und Sac II vorbereitet. Anschließend wurde dieses Fragment mit dem bereits im ersten Teilschritt erhaltenen C-terminalen Klon 12, der zuvor mit Kpn I und Sac II geöffnet wurde, in einem 1 : 1 bzw. 1 : 3 Ansatz ÜN ligiert. Schließlich konnte Klon 1 nach der Sequenzierung mit dem Primer pDSRed-seq-fw als korrektes Produkt identifiziert werden.

Im dritten Schritt wurde die N-terminale Region des E-Gens aus pCG-DV3 in einer PCR amplifiziert, wobei dazu die Primer 1 und 2 (siehe Kapitel 2.6) verwendet wurden. Nach der PCR zur Isolation der N-terminalen Region wurde die Bande aus dem Agarosegel isoliert und gereinigt. Danach konnte das Produkt mit Sac I und Kpn I verdaut werden und in Klon 1 aus dem zweiten Teilschritt in einer 1 : 1 bzw. 1 : 3 Ligation ÜN kloniert werden. Somit konnte das Trilinking an dieser Stelle im pDSRed 2-C1-Vektor erfolgreich abgeschlossen werden.

In einem letzten Schritt wurde die zusammengesetzte E-Gensequenz aus dem pDSRed 2-C1-Vektor mit Hilfe einer durch den Primer 1 inserierten BamHI-Stelle (vor Beginn der E-Sequenz, siehe Kapitel 2.6) und der sich im pDSRed 2-C1-Vektor befindlichen BamHI-Restriktionsschnittstelle isoliert werden. Der bereits mit BamHI geöffnete pCG-eGFP-Vektor konnte nun in einer 1 : 1 bzw. 1 : 3 Ligation ÜN mit dem zuvor beschriebenen Fragment verwendet werden. Nachdem verschiedene Kolonien mit Hilfe der pCG-fw- und pCG-rev-Primer in einer PCR auf ihre korrekte Orientierung untersucht wurden, konnten pCG-eGFP-DV3-E-Tri Klon 3, 6 und 14 als korrekte Klone identifiziert werden (siehe Abbildung 4.3.3.4).



- Der dritte Klonierungsansatz bestand darin, den N-terminalen prM+E-Gensequenzbereich bis AS 652 mit der zytoplasmatischen Region (Carboxyterminus) von MuLV-ENV zusammen in den pCG-eGFP-Vektor zu klonieren (Bilinking). Das Bilinking-Produkt wurde durch eine partielle Amplifikation des pDSred-Trilinking-Produkts mit den Primern 1 und 4A (siehe Kapitel 2.6) gewonnen. Nach einer anschließenden Gelaufreinigung wurde mit dem Restriktionsenzym BamHI verdaut und das erhaltene Fragment direkt in den mit BamHI geöffneten pCG-eGFP-Vektor in einer 1 : 1 bzw. 1 : 3 Ligation UN kloniert.

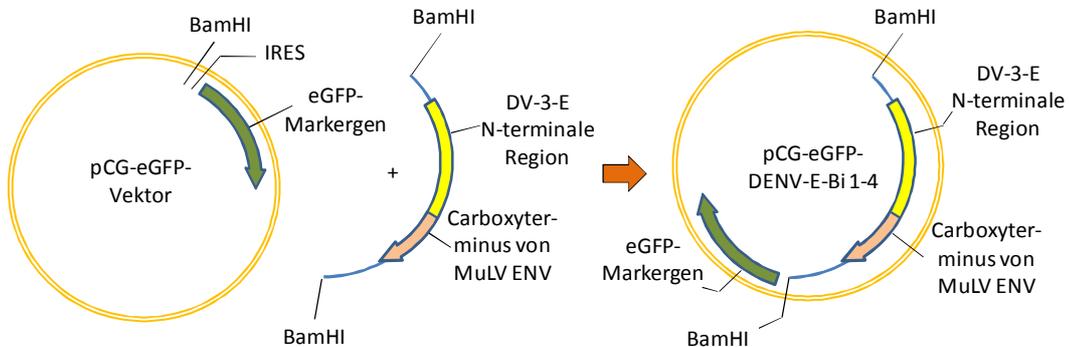


Abbildung 4.3.3.5: Klonierungsstrategie 3: Der mit BamHI geöffnete pCG-eGFP-Vektor wird mit der N-terminalen Region des E-Proteins aus pCG-DV3 und der zytoplasmatischen Region (Carboxyterminus) von MuLV ENV aus pcsi-MEA ligiert.

Nach Erhalt und Präparation verschiedener Klone wurde deren Orientierung mit Hilfe des pCG-fw und des 4A Primers überprüft. Durch Selektion der Klone mit korrekter Orientierung konnten pCG-eGFP-DV3-E-Bi Klon 7 und 21 als perfekt ligiertes Bilinking-Produkt identifiziert werden (siehe Abbildung 4.3.3.6).

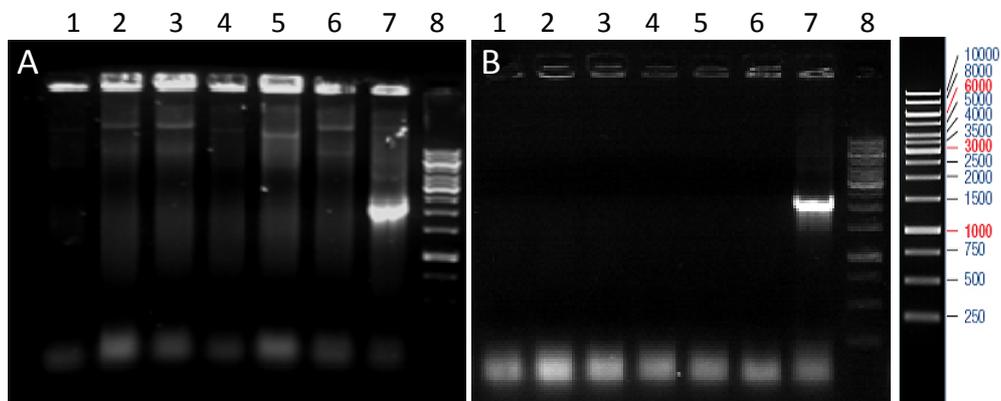


Abbildung 4.3.3.6: Gelaufnahmen der PCR-Produkte, die nach der Amplifikation mit den Primern pCG-fw und 4A entstanden sind. (A) Spur 1 - 7: Klone 1 - 7; Spur 8: 1 kb Marker. Klon 7 ist ein korrekter Bilinking-Klon; (B) Spur 1 - 7: Klone 15 - 21; Spur 8: 1 kb Marker. Klon 21 ist ein korrekter Bilinking-Klon.

4.3.3.1 Kontrolle der Sequenzen der klonierten Plasmide pCG-eGFP-DV3-E-N, pCG-eGFP-DV3-E-Bi und pCG-eGFP-DV3-E-Tri

Um sicher zu gehen, dass die in den pCG-eGFP-Vektor eingefügten Fragmente in richtiger Orientierung und ohne weitere Veränderungen der auf die Ligationsstelle folgende Sequenz inseriert hatten, wurden die ausgewählten Klone mit Hilfe der Primer pCG-fw und pCG-rev sequenziert und kontrolliert (siehe Kapitel 2.6).

Dabei konnte pCG-eGFP-DV3-E-N Klon 2 als Produkt mit korrekter Orientierung und Sequenz nach der Sequenzierung identifiziert werden (siehe Abbildung 4.3.3.1):

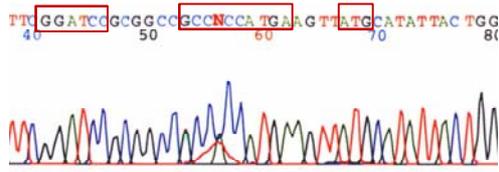


Abbildung 4.3.3.1: Die im Kasten markierten Sequenzen zeigen zum einen die eingefügte BamHI-Schnittstelle, die Kozak-Consensus-Sequenz, in der das erste Startcodon bereits enthalten ist, und letztlich das zweite Startcodon in pCG-eGFP-DV3-E-N 2.

Für das Plasmid pCG-eGFP-DV3-E-Tri konnten die Klone 3, 6 und 14 (stellvertretend wird Klon 6 gezeigt) mit korrekter Orientierung und Sequenz nach der Sequenzierung identifiziert werden (siehe Abbildung 4.3.3.2):

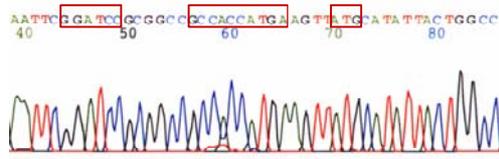


Abbildung 4.3.3.2: Die im Kasten markierten Sequenzen zeigen zum einen die eingefügte BamHI-Schnittstelle, die Kozak-Consensus-Sequenz, in der das erste Startcodon bereits enthalten ist, und letztlich das zweite Startcodon in pCG-eGFP-DV3-E-Tri 6.

Schließlich konnten pCG-eGFP-DV3-E-Bi Klon 7 und 21 (stellvertretend wird Klon 7 gezeigt) mit korrekter Orientierung und Sequenz nach der Sequenzierung mit dem pCG-Vektor-Sequenzierprimer fw identifiziert werden (siehe Abbildung 4.3.3.3):

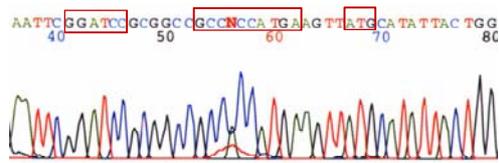


Abbildung 4.3.3.3: Die im Kasten markierten Sequenzen zeigen zum einen die eingefügte BamHI-Schnittstelle, die Kozak-Consensus-Sequenz, in der das erste Startcodon bereits enthalten ist, und letztlich das zweite Startcodon in pCG-eGFP-DV3-E-Bi 7.

Alle Sequenzen der Klone wurden nicht nur im vorderen Bereich der Sequenz geprüft, die hier in Abbildung 4.3.3.1, 4.3.3.2 und 4.3.3.3 zu sehen sind, sondern auf ihre Richtigkeit im Vergleich mit den erwarteten zusammengestellten Sequenzen komplett bis zum Ende des Inserts untersucht. Dabei konnte für alle Klone die korrekte Sequenz durch Sequenzierung bestätigt werden.

4.3.3.2 Expression des E-Proteins nach Transfektion mit pCG-eGFP-DV3-E-N, pCG-eGFP-DV3-E-Bi und pCG-eGFP-DV3-E-Tri

Im Darauffolgenden wurde die Expression von pCG-GFP-DV3-EN mit Hilfe einer Transfektion auf Vero-Zellen getestet und das Ergebnis im Lichtmikroskop analysiert.

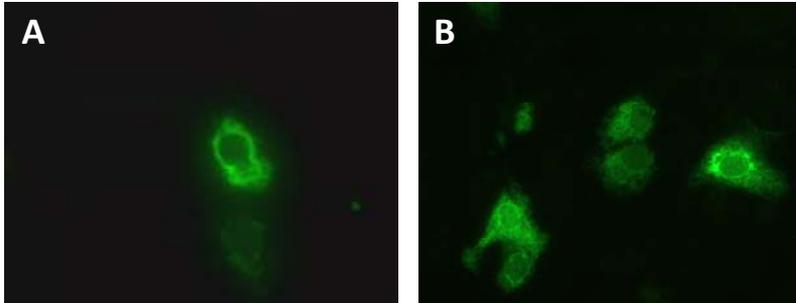


Abbildung 4.3.3.2.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen, die mit 2 µg pCG-eGFP-DV3-E-N, (GFP) (A) und im Vergleich mit 2 µg pCG-DV3 (B) transfiziert wurden. (B) grüne E-Proteinfärbung durch mit α -Denguecomplex, pan (1 : 400) und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) (Fluoreszenzmikroskop; 40fache Vergrößerung).

Wie man in den Immunfluoreszenzaufnahmen erkennen kann, waren einige Zellen mit dem hergestellten pCG-eGFP-DV3-E-N Plasmid transfiziert worden (grün, Abbildung 4.3.3.2.1 (A)). Allerdings war nach Färbung des E-Proteins mit α -Denguecomplex, pan (1 : 400) und einem Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) keine E-Proteinexpression in pCG-eGFP-DV3-E-N transfizierten Zellen im Vergleich zu (B) zu erkennen (nicht gezeigt). In Abbildung 4.3.3.2.1 (B) hingegen ist eine gleichmäßige E-Proteinfärbung zu erkennen, die mit Hilfe einer Immunfluoreszenzfärbung mit α -Denguecomplex, pan (1 : 400) und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) zustande kam.

Außerdem wurde die Expression des E-Proteins von pCG-eGFP-DV3-E-Tri 3, 6 und 14 mit Hilfe einer Transfektion auf Vero-Zellen und 293T-Zellen getestet und das Ergebnis im Fluoreszenzmikroskop analysiert. In Abbildung 4.3.3.2.2 ist nur die Expression auf 293T-Zellen zu sehen, wobei in A, B und C die jeweilige eGFP-Expression der verwendeten Plasmide zu sehen ist.

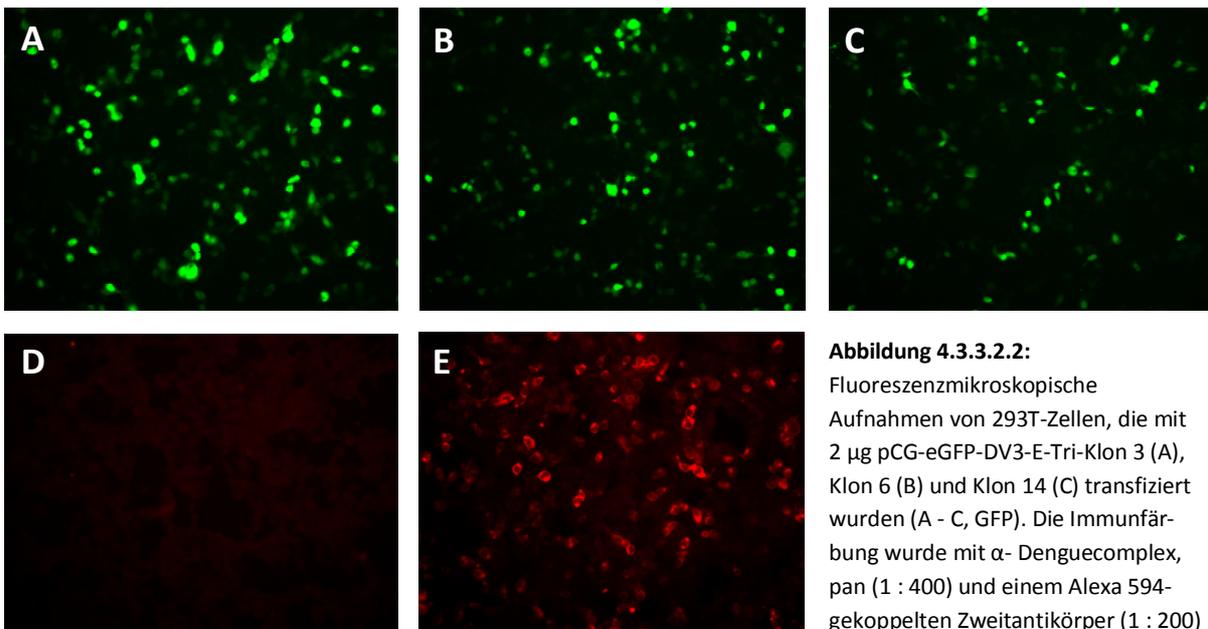


Abbildung 4.3.3.2.2: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellen, die mit 2 µg pCG-eGFP-DV3-E-Tri-Klon 3 (A), Klon 6 (B) und Klon 14 (C) transfiziert wurden (A - C, GFP). Die Immunfärbung wurde mit α -Denguecomplex, pan (1 : 400) und einem Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200)

angefertigt (D - E). (D) E-Proteinfärbung stellvertretend für alle drei Trilinking-Klone und (E) im Vergleich dazu mit pCG-DV3 transfizierten Zellen. (rot: E-Proteinfärbung; grün eGFP; Fluoreszenzmikroskop; 20fache Vergrößerung).

In den Immunfluoreszenzbildern kann beobachtet werden, dass das Plasmid pCG-eGFP-DV3-E-Tri 3 am stärksten GFP und pCG-eGFP-DV3-E-Tri 14 eGFP am schwächsten exprimiert. Alle drei Plasmide exprimieren jedoch kein E-Protein, was im Vergleich zur Kontrolle unter Verwendung von pCG-DV3 deutlich zu erkennen ist (Abbildung 4.3.3.2.2 (E)).

Letztlich wurde noch die Expression von pCG-eGFP-DV3-E-Bi 7 und 21 mit Hilfe einer Transfektion in Vero-Zellen und 293T-Zellen getestet und das Ergebnis im Fluoreszenzmikroskop analysiert. In Abbildung 4.3.3.2.3 ist die Expression in 293T-Zellen zu sehen, wobei in (A) und (B) die jeweilige eGFP-Expression der verwendeten Plasmide zu erkennen ist.

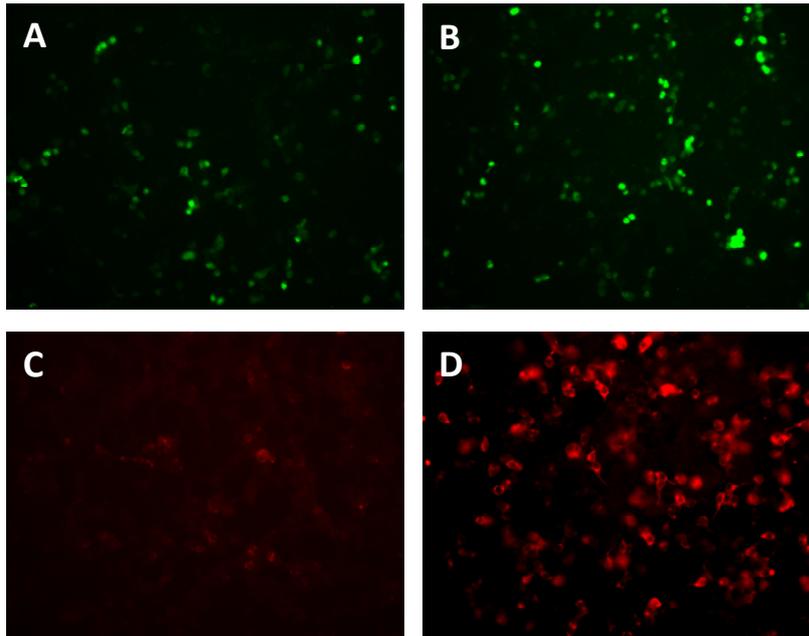


Abbildung 4.3.3.2.3: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von 293T-Zellen, die mit 2 µg pCG-eGFP-DV3-Bi-Klon 7 (A) und Klon 21 (B) transfiziert wurden (A - B, GFP). Die Immunfärbung wurde mit α-Denguecomplex, pan (1 : 400) und einem Alexa 594-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) angefertigt (C - D) und ist in (C) stellvertretend für beide Bilinking-Klone zu sehen und in (D) im Vergleich mit pCG-DV3 transfizierten Zellen. (rot: E-Proteinfärbung; grün eGFP; Fluoreszenzmikroskop; 20fache Vergrößerung).

Abschließend kann festgestellt werden, dass die Expression des E-Proteins letztlich nur bei pCG-DV3 transfizierten Zellen tatsächlich effizient funktioniert (Abbildung 4.3.3.2.3 (D)). Die getesteten Bilinking-Klone zeigten eventuell eine leichte E-Proteinexpression (C). Diese war aber weitaus niedriger als die der pCG-DV3 transfizierten Zellen. Weiterhin ist zu erkennen, dass die eGFP-Expression der verwendeten Klone voneinander abweicht, dies aber nicht in Korrelation zur E-Proteinexpression steht.

4.3.4 Dengue-Virus Infektion zur Isolierung der E-Protein-cDNA

Aufgrund der nicht exprimierenden Plasmide und Vektoren, die bereits in den vorher gezeigten Klonierungsversuchen hergestellt wurden und zu keinerlei Verbesserung der E-Proteinexpression von DENV 3 E-Protein bzw. überhaupt keiner Expression des DENV 1, 2 und 4 E-Proteins führten, sollte aus dem Virus isolierte RNA in cDNA umgeschrieben werden. Im Anschluß sollte die cDNA zur Isolation der E-Gensequenzen von DENV 1 - 4 genutzt werden, um dann in den bereits benutzten und gut funktionierenden eGFP-Vektor kloniert zu werden.

Des Weiteren sollte die Möglichkeit geprüft werden, ob in DENV-Infektions-Assays die Testung bereits vorhandener Inhibitoren ermöglicht werden könnte. Dazu sollte die Eigenschaft der DENV genutzt werden, Foci oder Infektionsherde zu verursachen (Hrobowski et al., 2005). Deren Reduktion nach Peptidbehandlung sollte als Maß für deren Wirkung dienen, was bereits zur Untersuchung verschiedener Peptide verwendet worden war.

4.3.4.1 Etablierung der Dengue-Virus Infektion

Da die bisherigen Versuche, mit den E-Protein-exprimierenden Vektoren zu keinem befriedigenden Ergebnis geführt hatten, sollte nun nur die E-Gensequenz aus dem Virusgenom isoliert werden. Dies sollte eine neue Klonierung des E-Proteins in die vorhandenen Vektoren ermöglichen.

Hierzu musste zuerst die DENV-Infektion im S3-Labor mit aus Hamburg erhaltenen DENV 1 - 4 Stämmen etabliert werden. Nach verschiedenen Ansätzen wurden Vero-Zellen als Kulturzellen zur Viruszüchtung verwendet, wobei in keinem Fall die Bildung von Plaques zu sehen war (Abbildung 4.3.4.1) Somit konnte das gezüchtete Virus nicht auf Vero-Zellen titriert werden, was mit Hilfe eines Standard-Plaque-Assays und eines TCID50-Tests versucht wurde (Abbildung 4.3.4.1). In beiden Fällen wurde eine MOI von 0,1 bis 1 verwendet, wobei keinerlei Plaquebildung zu beobachten war, die eindeutige Titerangaben möglich gemacht hätten (Abbildung 4.3.5.1 (B)). Auch in der Viruszucht selbst konnte auf Vero-Zellen keine Bildung von Plaques beobachtet werden, wie das durch verschiedene Arbeitsgruppen bereits beschrieben worden war. Folglich konnte die Dengue-Infektion nicht durch Bildung sogenannter Plaques oder Synzytien wie bei den Paramyxoviren (C) sichtbar gemacht werden.

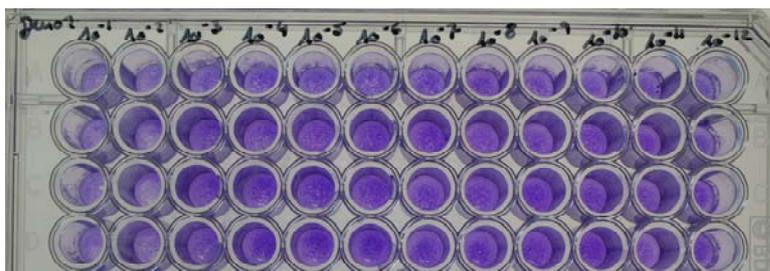


Abbildung 4.3.4.1: Ausschnitt einer Aufnahme von Vero-Zellen, die mit DENV 2-Überstand in einem TCID50-Test titriert wurden. Die Zellen wurden zuvor mit einer MOI von 1 mit DENV 2 infiziert. Reihe 1 - 12 zeigen die verschiedenen verwendeten Verdünnungen in mehreren Wiederholungen (A - D: wells nach unten) des Virusüberstandes, aber keinerlei Plaquebildung.

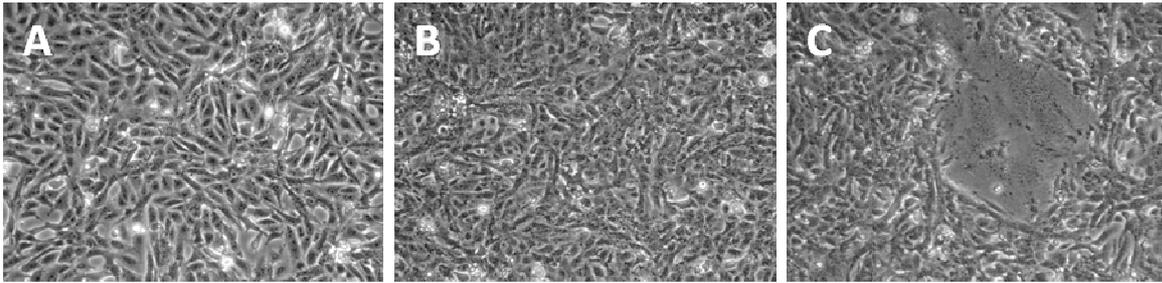


Abbildung 4.3.4.2: DENV-Infektion auf Vero-Zellen. (A) Kontrolle ohne Infektion; (B) 3 Tage nach DENV-Infektion; (C) im Vergleich MV-Infektion nach 1 Tag. Die Zellen wurden zuvor mit einer MOI von 1 infiziert. (Lichtmikroskop, 20fache Vergrößerung).

Da alle Versuche zur Bestimmung des Virustiters bisher fehl geschlagen waren, wurde eine Titration mittels Immunfluoreszenz etabliert, bei der die Virusüberstände wie auch bei der Standard-Plaquetitration eingesetzt wurden, der Titer allerdings nach sieben Tagen durch eine Immunfluoreszenzfärbung bestimmt wurde. Die Färbung wurde dabei mit Hilfe des Erstantikörpers α -Denguecomplex, pan (1 : 400), der das E-Protein aller Serotypen erkennt, und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) durchgeführt. Dabei konnte festgestellt werden, dass sich die unterschiedlichen Serotypen auch unterschiedlich schnell in Zellkultur ausbreiten (Abbildung 4.3.4.3 und 4.3.4.5).

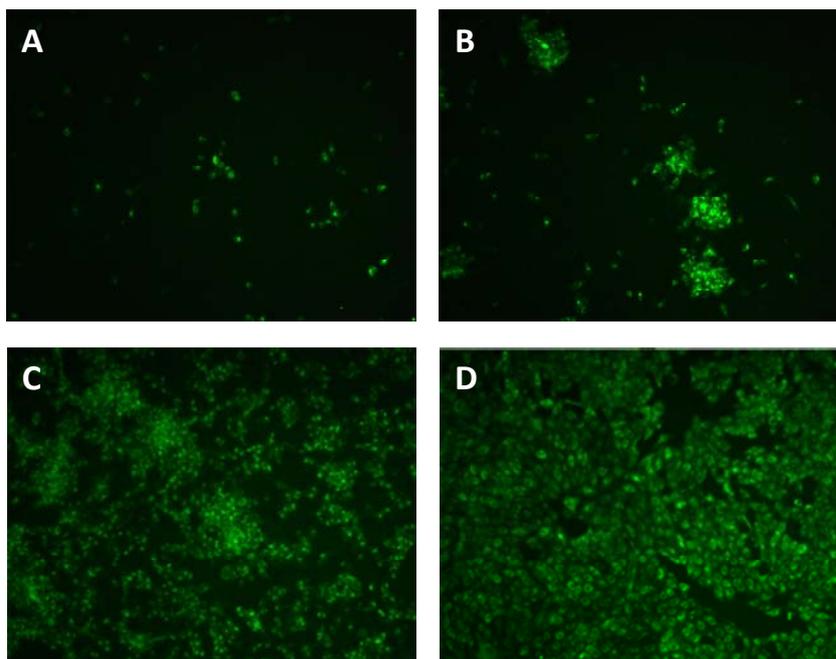


Abbildung 4.3.4.3: DENV 1 Infektion auf Vero-Zellen mit einer MOI = 1 sichtbar gemacht durch eine Immunfärbung mit α -Denguecomplex, pan (1 : 400) und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200). (A) Infektion nach 1 Tag; (B) Infektion nach 2 Tagen; (C) Infektion nach 2 - 3 Tagen; (D) Infektion nach 3 Tagen; für DENV 2 sind diese Infektionsschritte um ca. 1 Tag nach hinten verschoben (Fluoreszenzmikroskop, 10fache Vergrößerung).

In Abbildung 4.3.4.3 (A - D) ist deutlich zu erkennen, wie sich DENV 1 innerhalb eines Zeitraumes von 3 Tagen über die gesamte Zellkultur ausbreitet. Dabei konnte bei der Infektion von DENV 2 eine Verzögerung von ca. 1 Tag beobachtet werden, so dass das Infektionsstadium, wie in Abbildung 4.3.4.3 (D) zu sehen nach maximal vier Tagen erreicht wurde.

Dabei kann im Detail beobachtet werden, wie unterschiedlich die Verteilung des E-Proteins innerhalb der Zelle ist, je nachdem, ob sich die infizierte Zelle in einem frühen oder einem späten Stadium der Infektion befindet (Abbildung 4.3.4.4 (A) und (B)).

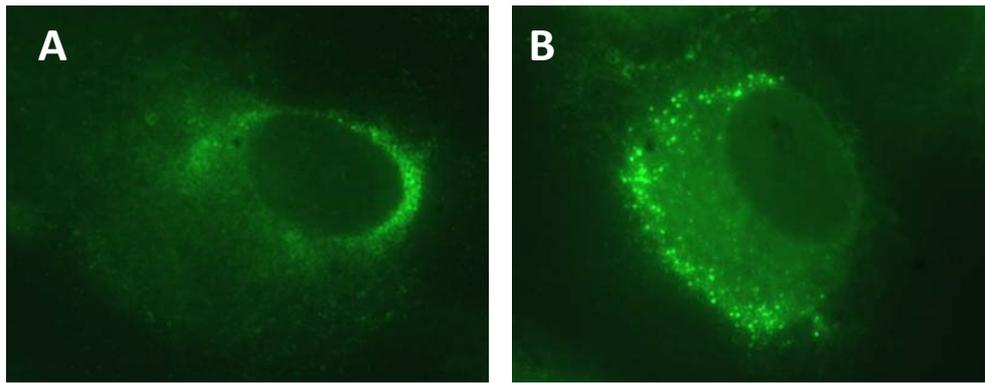


Abbildung 4.3.4.4: DENV-Infektion auf Vero-Zellen mit einer MOI = 1 sichtbar gemacht durch eine Immunfärbung mit α -Denguecomplex, pan (1 : 400) und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200). (A) Frühes Infektionsstadium; (B) spätes Infektionsstadium einer DENV-infizierten Zelle (Fluoreszenzmikroskop, 60fache Vergrößerung).

In einem frühen Stadium der Infektion sind die meisten E-Proteine nach ihrer Translation am ER lokalisiert, wo sie gemeinsam mit anderen Proteinen auf die Anlagerung der viralen RNA und den darauffolgenden vorläufigen Zusammenbau der viralen Partikel warten (Abbildung 4.3.4.4 (A)). Am Ende des Infektionszyklus sind die viralen Partikel, mit dem E-Protein an der Oberfläche, an der äußeren Zellmembran lokalisiert, wo sie letztlich durch Budding entlassen werden (Abbildung 4.3.4.4 (B)).

Neben diesen unterschiedlichen Infektionsstadien in den Zellen selbst läuft die Infektion von DENV 3 zeitverschoben zu der von DENV 1 und 2 ab (Abbildung 4.3.4.5).

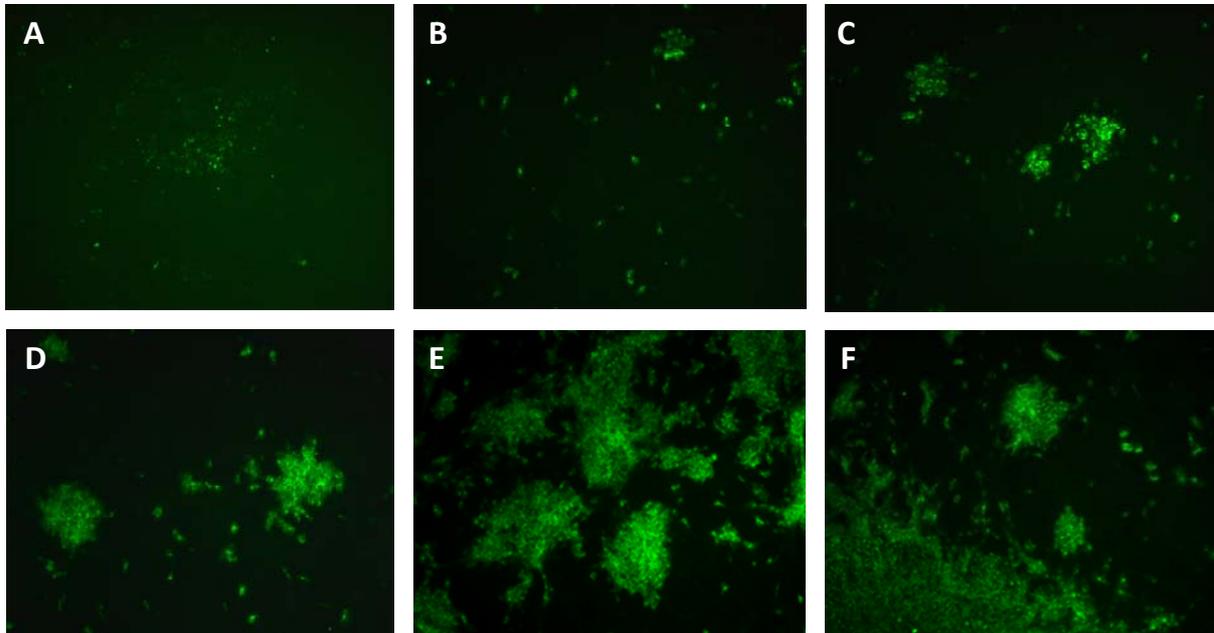


Abbildung 4.3.4.5: DENV 3 Infektion auf Vero-Zellen mit einer MOI = 1 sichtbar gemacht durch eine Immunfärbung mit α -Denguecomplex, pan (1 : 400) und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200). (A) Infektion nach 2 Tagen; (B) Infektion nach 3 Tagen; (C) Infektion nach 4 Tagen; (D) Infektion nach 5 Tagen; (E) Infektion nach 6 Tagen; (F) Infektion nach 6 - 7 Tagen. Für DENV 4 sind diese Infektionsschritte um ca. 2 - 3 Tage nach hinten verschoben (Fluoreszenzmikroskop, 10fache Vergrößerung).

In Abbildung 4.3.4.5 ist im Zeitverlauf von A bis F zu sehen, dass DENV 3 wesentlich längere Zeit in Anspruch nimmt, um die Zellkultur komplett zu infizieren, als DENV 1 in Abbildung 4.3.4.3. Weiterhin konnte beobachtet werden, dass die Vermehrung mit DENV 4 zusätzlich 2 - 3 Tage länger benötigt, um die komplette Infektion des Zellrasens zu gewährleisten. Somit wurde der Infektionszeitraum zur Vermehrung der verschiedenen Dengue-Serotypen dem Wachstum des jeweiligen Serotyps angepasst.

4.3.4.2 Isolierung des E-Gens aus dem Virusgenom

Sobald die Virusvermehrung auf Vero-Zellen etabliert worden war, konnte die RNA mit Hilfe des GenElute™ Mammalian Total RNA Purification Kits aus den infizierten Vero-Zellen isoliert werden und mit Hilfe der reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden (siehe Kapitel 3.4.15). Davon wurden für einen nachfolgenden PCR-Ansatz jeweils 2 µl verwendet und mit den dafür ausgewählten fw- und rev-Primern aus dem in cDNA umgeschriebenen Virusgenom isoliert. Dabei wurden die Primer so entworfen, dass damit die komplette E-Protein Gensequenz, die ca. 1.484 bp groß ist, ausgeschnitten werden konnte und jedes Primerpaar zusätzlich noch jeweils eine BamHI-Schnittstelle enthielt. Bevor diese in einem Verdau genutzt wurde, um die Fragmente für die Klonierung vorzubereiten, wurden die PCR-Produkte auf ein 1,5%iges Agarosegel aufgetragen, um sie auf ihre Richtigkeit zu prüfen (siehe Abbildung 4.3.4.2.1). Dabei handelte es sich um Fragmente mit einer Größe von etwa 1.560 bp.

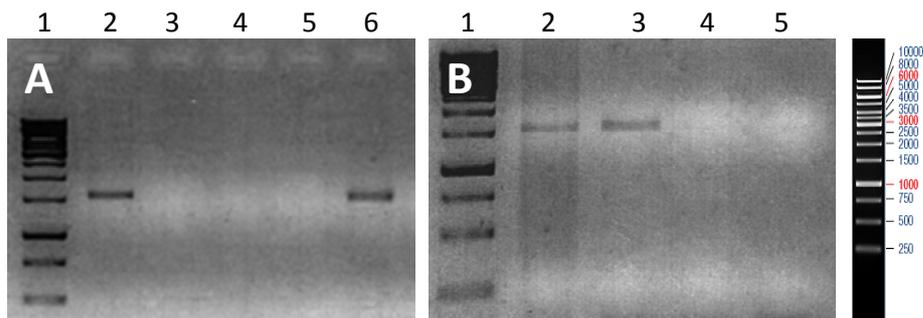


Abbildung 4.3.4.2.1: Gelaufnahmen der PCR-Produkte, die nach der Amplifikation mit dem Primern Den01mutisoenv-fw- und rev, Den02mutisoenv-fw und -rev, Den03mutisoenv-fw und -rev und Den04mutisoenv-fw und -rev entstanden sind. In (A) ist in Spur 2 das E-Fragment von DENV 2 und in Spur 6 das von DENV 1 zu sehen. In (B) ist in Spur 2 das E-Fragment von DENV 4 und in Spur 3 das von DENV 3 zu sehen. Spur 1 jeweils: 1 kb Marker.

Anschließend wurden die Fragmente von DENV 1 - 4 (siehe Abbildung 4.3.4.2.1 (A) Spur 2, 6 und (B) Spur 1, 2) aus dem Agarosegel extrahiert und in einem Verdau mit BamHI auf die Ligation vorbereitet. Die Ansätze des Verdau wurden dann zur Aufreinigung ein weiteres Mal auf ein 1,5 %iges Agarosegel aufgetragen und isoliert. Nach der Isolation konnten die Fragmente direkt für die Klonierung verwendet werden.

4.3.4.3 Klonierung der aus dem Virus isolierten E-Gensequenz in den pCG-eGFP-Vektor

Nach dem Verdau der mittels PCR isolierten Fragmente der E-Gensequenz mit BamHI von DENV 1 - 4 waren diese bereit für eine 1 : 1, 1 : 3 und 1 : 5 Ligation (ÜN) mit dem mit BamHI geöffneten pCG-eGFP-Vektor. Die dadurch entstehenden Plasmide sollten pCG-eGFP-DENV-E 1 - 4 genannt werden. In Abbildung 4.3.4.3.1 ist die Klonierungsstrategie im Schaubild gezeigt.

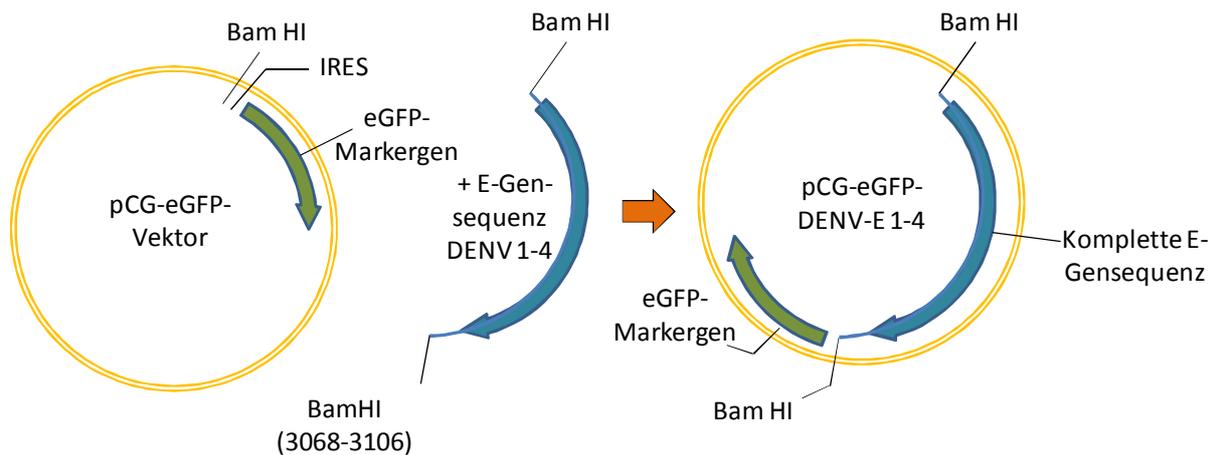


Abbildung 4.3.4.3.1: Klonierungsstrategie zur Herstellung von pCG-eGFP-DENV-E 1 - 4. Der mit BamHI geöffnete pCG-eGFP-Vektor wurde mit dem mit BamHI ausgeschnittenen E-Fragment aus dem in cDNA umgeschriebenen Virusgenom ligiert.

Nach Transformation der Ansätze in kompetente Bakterien konnten dann Kolonien gepickt und mit Hilfe einer PCR, die zur Sequenzierung und zur Kontrolle der Orientierung des inserierten Fragments dienen sollte, untersucht werden. Dabei wurden wiederum die Primer pCG-fw und pCG-rev eingesetzt.

In keinem der vier Klonierungsansätze konnte eine erfolgreiche Klonierung dokumentiert werden. Obwohl die Klonierungsansätze in ihrem molaren Verhältnis von Insert zu Vektor variiert und die RNA-Präparation sowie die Umschreibung in cDNA wiederholt wurde, konnten keine positiven Klone gepickt werden. Da auch die Größe der isolierten Fragmente vor und nach der Gelextraktion geprüft wurden und diese korrekt war, ist es bisher unerklärlich, warum diese Klonierung nicht zum Erfolg führen konnte.

4.3.5 DENV-Infektion zur Untersuchung kleiner Inhibitormoleküle

Da die Etablierung eines Systems zur Bildung pseudotypisierter viraler Partikel nicht erfolgreich abgeschlossen werden konnte, sollten die bereits synthetisierten Peptide Den01, Den02, Den03 und Den04a in Infektions-Assays getestet werden. Diese wurden aus Teilen des bereits veröffentlichten Peptids DN59 (Hrobowski et al., 2005) synthetisiert, um ihre Wirkung auf die Virusaufnahme zu untersuchen. DN59 ist ein Peptid, das DENV-Infektionen hemmt und mit der Stammdomäne des Dengue-Virus E-Proteins interagiert.

Dazu wurden Vero-Zellen, die sich auf 12-well-Platten befanden, mit einer MOI = 0,5 mit DENV 2 für 1 h in serumfreiem Medium infiziert. Gleichzeitig wurden 1 μ M, 2 μ M, 4 μ M der Substanzen Den01, Den02 und Den04a sowie 2 μ M, 4 μ M, 10 μ M der Substanz Den03 für ebenfalls 1 h mit dem Virus inkubiert. Diese Werte orientierten sich an der Angabe von Hrobowski et al., da für das Originalpeptid DN59 eine wirksame Konzentration von < 20 μ M angegeben war. Anschließend wurde die Mischung abgenommen, die Zellen 1 Mal gewaschen und mit 5 % FCS MEM-Medium versorgt. Nach drei Tagen wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit HB46 (1 : 100) sowie einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200) gefärbt. Schließlich konnten folgende Beobachtungen im Fluoreszenzmikroskop dokumentiert und fotografiert werden (siehe Abbildung 4.3.5.1). So ist zu erkennen, dass die beiden Peptide Den01 und Den02 (B, C) die Ausbildung der Dengue-Infektionsherde im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle in (A) stark eindämmen konnten. Im Gegensatz dazu konnte bei Verwendung der Peptide Den03 kaum und Den04a (D, E) kein Unterschied zur Kontrolle beobachtet werden.

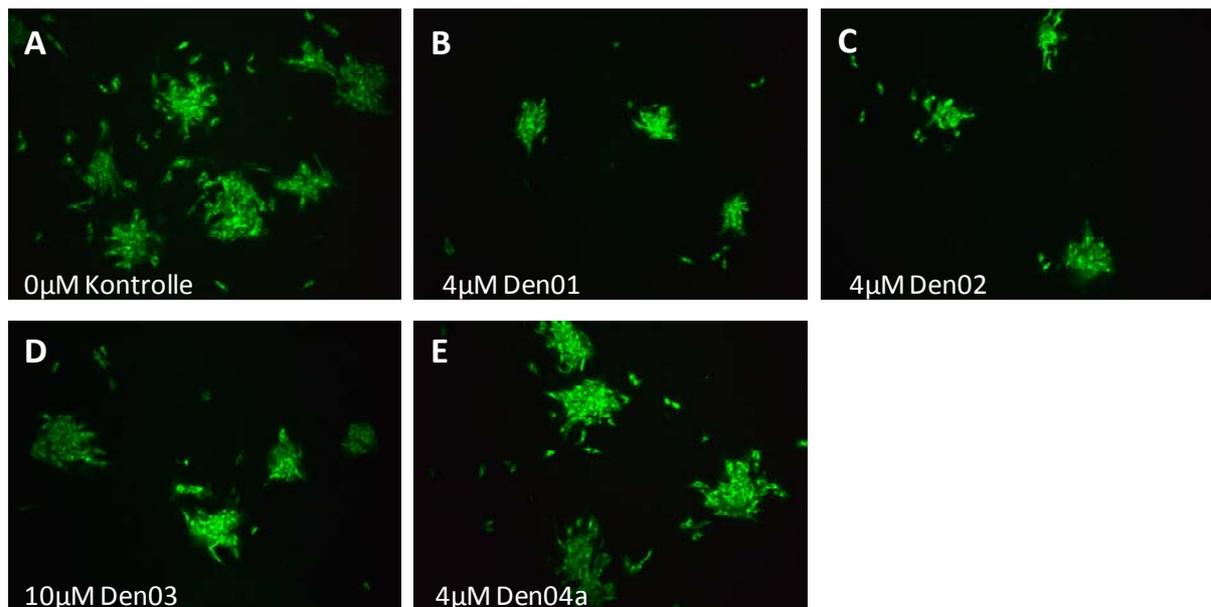


Abbildung 4.3.5.1: Fluoreszenzmikroskopische Aufnahmen von Vero-Zellen, die mit DENV 2 MOI = 0,5 (A - E) transfiziert und mit verschiedenen Peptiden Den01, Den02, Den03 und Den04a gleichzeitig für 1 h inkubiert wurden. Die Immunfärbung erfolgte mit HB46 (1 : 100) und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200). In (A) sind als Kontrolle infizierte Vero-Zellen ohne Peptidinkubation zu sehen; die jeweilig verwendete Konzentration der Peptide ist im Bild vermerkt (B - E); (Fluoreszenzmikroskop; 20fache Vergrößerung).

Um auszuschließen, dass die Hemmung, die in Abbildung 4.3.5.1 beobachtet wurde, ein Effekt des Lösungsmittels war, in dem die Peptide gelöst wurden, wurde der Gesamt-DMSO-Gehalt bei 4 µM ermittelt und festgestellt, dass sich keines der Peptide, auch in höheren Konzentrationen, dem kritischen DMSO-Wert von 2,5 % (ermittelt in Kapitel 4.2.1) annäherte. Daher kann bei der beobachteten Hemmung in Abbildung 4.3.5.1 von einem tatsächlichen Effekt der Peptide ausgegangen werden.

Verwendete Peptide	Gesamt-DMSO-Gehalt bei 4 µM Endkonzentration/ml der Peptide
Den01	0,01 %
Den02	0,01 %
Den03	0,01 %
Den04a	0,01 %

Tabelle 4.3.5.1: Gesamt-DMSO-Gehalt in % in einem Endvolumen von 1 ml bei einer verwendeten Konzentration von 4 µM. Alle Substanzen in diesen Konzentrationen, liegen im Bereich von bis zu 2,5 %, in dem die Zellen absolut vital sind.

Um abschließend die Daten weiter zu bestätigen, wurden die verschiedenen Peptidansätze nach der Immunfluoreszenzfärbung in einem Fluoreszenzreader gemessen, um die am Mikroskop beobachteten Ergebnisse zu bestätigen. Hierfür wurde die Immunfluoreszenz an neun gleichmäßig über den Napf verteilten Stellen drei Mal gemessen und der Durchschnittswert pro Napf angegeben. Zusätzlich wurden vier unabhängige Versuche angesetzt und der Durchschnitt prozentual im Verhältnis zur unbehandelten Fluoreszenzintensität der Kontrollzellen ohne Peptidinkubation umgerechnet. Zuvor wurde die Fluoreszenzintensität von komplett unbehandelten, uninfizierten Vero-Zellen, die nur mit dem Zweitantikörper als Kontrolle inkubiert wurden, ermittelt, und dieser Hintergrundwert von den jeweiligen Werten der anderen

Ansätze abgezogen. Schließlich konnten die gemessenen Daten in folgendem Diagramm ausgewertet werden (siehe Abbildung 4.3.5.2).

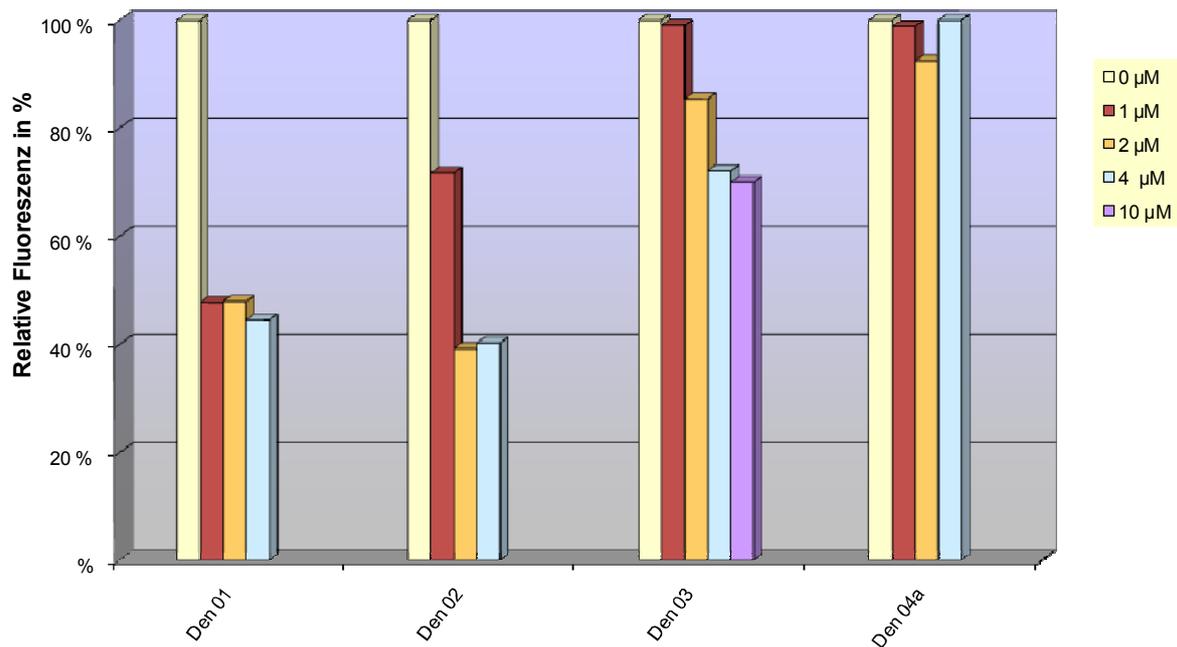


Abbildung 4.3.5.2: Prozentuale Angabe der Fluoreszenzintensitäten pro Napf von mit DENV 2 (MOI = 0,5) infizierten Vero-Zellen, die ohne (gelbe Balken) oder mit verschiedenen Peptiden Den01, Den02, Den03 und Den04a gleichzeitig für 1 h inkubiert wurden (bunte Balken, siehe Legende). Die Werte wurden im Verhältnis zur Kontrolle in Prozent umgerechnet. Die Immunfärbung erfolgte mit HB46 (1 : 100) und einem Alexa 488-gekoppelten Zweitantikörper (1 : 200). Das Diagramm zeigt einen Durchschnittswert aus vier unabhängigen Versuchen.

Abschließend ist zu bemerken, dass durch die Auswertung der Ergebnisse aus Abbildung 4.3.5.2 die Ergebnisse der Immunfluoreszenzfärbungen bestätigt werden konnten. Somit konnte durch die Messung der Fluoreszenzintensitäten herausgefunden werden, dass sowohl das Peptid Den01 als auch Den02 die Infektion um ca. 60 %, im Gegensatz zu unbehandelten, infizierten Vero-Zellen hemmen konnten. Dabei konnte sich bei Verwendung von Den01 bereits bei sehr niedriger Konzentration von 1 µM die maximal Hemmung einstellen, wobei Den02 bei 1 µM zuerst eine leichte und ab 2 µM eine starke Hemmung der Infektion zeigte. Die Substanz Den03 zeigte eine leichte Hemmung der DENV-Infektion, Den04a hingegen keinerlei Auswirkungen auf die DENV 2-Infektion, was auch schon in den Auswertungen am Fluoreszenzmikroskop beobachtet worden war. Die Verwendung höherer Konzentrationen (bis zu 8 µM und 20 µM) führte zu keiner weiteren Reduktion der DENV-Infektion (Daten nicht gezeigt).

Somit konnten zwei gut hemmende Peptide, Den01 und Den02, die Infektion um ca. 60 % reduzieren. Beide Peptide wurden aus den vorderen Aminosäuren des DN59-Peptids synthetisiert, die einen Teil der Stammdomäne des Dengue-Virus E-Proteins imitieren und somit durch Wechselwirkung mit den E-Protein-Domänen I, II und /oder III vermutlich zur Infektionshemmung führen können. Das Peptid Den03 konnte hingegen die DENV 2-Infektion nur leicht, um ca. 30 %, hemmen.

5 Diskussion

Im Rahmen der vorliegenden Doktorarbeit wurden drei Themengebiete bearbeitet, die von der Aufklärung des Fusions-Inhibitionsmechanismus des CD9-Antikörpers mAK K41 über die Etablierung eines Inhibitor-Testsystems für die Paramyxovirus-Fusion bis hin zur Etablierung eines Inhibitor-Testsystems für die DENV-Aufnahme reichten. Daher soll nun im Folgenden auf die drei Themengebiete eingegangen und diese diskutiert werden.

Der monoklonale Antikörper mAK K41, dessen Wirkungsweise untersucht werden sollte, ist gegen das CD9-Molekül auf der Oberfläche verschiedener Zelllinien gerichtet, welches zur Transmembran-4-Protein-Superfamilie gehört, zu der auch CD37, CD53, CD63, CD81, CD151 sowie CD82/TAPA-1 zählen. Biochemische und mikroskopische Untersuchungen zeigten, dass Tetraspanine physikalisch untereinander in homologer (Kovalenko et al., 2004) oder heterologer Assoziation (Espenel et al., 2008) stehen und mit anderen Gewebetyp-spezifischen Proteinen der Zellmembran wechselwirken, wobei Tetraspanin-angereicherte Mikrodomänen (TEM; Tetraspanin enriched microdomains) entstehen (Boucheix und Rubinstein, 2001; Rubinstein et al., 1996; Szollosi et al., 1996; Yauch et al., 2000). Diese sind auch als Tetraspaninnetzwerk bekannt (Hemler et al., 2003; Rubinstein et al., 1996). So stehen sie mit Mitgliedern der Integrinfamilie, mit MHC-Klasse-II-Glykoproteinen (Zilber et al. 2005), mit CD2, CD4, und CD8 in Verbindung. Dabei ist speziell für CD9 eine Assoziation mit β_1 -Integrinen, CD46, Calnexin, den TMSF4-Molekülen CD63, CD81 und CD82, sowie dem 25 kDa-G-Protein bekannt (Rubinstein et al., 1996). Die Zusammensetzung des Netzwerkes ist in unterschiedlichen Zelltypen verschieden, wobei oft Wechselwirkungen mit Zelloberflächenrezeptoren, Adhäsionsmolekülen und Transmembransignalproteinen entstehen (Hemler et al., 2003). Verschiedene Tetraspanine können außerdem an der Zelloberfläche als Rezeptoren für die Virusbindung fungieren, wie beispielsweise CD81 bei Hepatitis C oder CD82 bei HTLV-1 (Cornier et al., 2004; Pique et al., 2000). Zusätzlich wurde 2007 bekannt, dass bei HIV-1 der Zusammenbau viraler Partikel, das Budding und die Ausbreitung von Zelle zu Zelle in Tetraspanin-angereicherten Domänen stattfinden (Jolly und Sattentau, 2007). Ferner ist CD9 mit dem Immunsystem assoziiert, da es natürlicherweise auf Monozyten exprimiert wird. Im Stadium der Monozytenreifung zum Makrophagen lagern sich CD9-Moleküle und β_1 -Integrin zu einem Komplex zusammen und involvieren dabei das CD46-Molekül (Lozahic et al., 2000). CD46 ist als ein Rezeptor für die Impfstämme von MV bekannt, was aber von CDV nicht als solcher genutzt werden kann. Ferner wird das CD9-Molekül selbst nicht als Rezeptor für die Aufnahme des Hundestaupe-Virus genutzt (Löffler et al., 1997), obwohl seine Blockierung mit Hilfe von mAK K41 zu einer starken Hemmung der CDV-Infektion führt.

Da bisher erhaltene Daten, dass mAK K41 die CDV-induzierte Zell-Zellfusion, nicht aber die Virus-Zell-Fusion, inhibiert, vermuten ließen, dass eventuell strukturelle Veränderungen der Plasmamembran die Aktivität oder das Expressionsmuster des bisher unbekanntem Rezeptors von CDV teilweise regulieren könnten, wurden Immunfluoreszenz-Untersuchungen der Membran und Zellkontakte ausgeführt. Dabei konnte gezeigt werden, dass mAK K41 eine Umlagerung bzw. einen Zusammenschluss des CD9-Moleküls an den Zellkontaktbereichen bewirkt (siehe Kapitel 4.1.1.1). Dies wurde sowohl für Epithel- als auch für Endothelzellen bestätigt. Des Weiteren konnte die Entstehung von großen, clusterartigen Zusammenschlüssen ausschließlich an den Zellgrenzen beobachtet werden. Diese schienen wie netzartige Gebilde und waren in Vero-Zellen und HUVECs ähnlich, während sie in HeLa-Zellen sehr viel kompakter wirkten. Im Gegensatz dazu vermochten Antikörper, die gegen andere Tetraspaninmoleküle gerichtet waren, wie das CD63- und CD81-Molekül, die ebenso wie CD9 in den TEMs organisiert sind, eine solche Veränderung an den Zellgrenzen nicht zu induzieren (siehe Kapitel 4.1.1.2). Zugleich konnte mit diesen Antikörpern keine Umlagerung des CD9-Moleküls induziert werden (Daten nicht gezeigt).

Nähere Untersuchungen am konfokalen und Rasterelektronenmikroskop zeigten, dass dieser Cluster-Prozess des CD9-Moleküls bereits innerhalb von 2 h sichtbar war und es sich somit um eine sehr schnelle Umlagerung des CD9 an den Zellkontaktstellen handelte (siehe Kapitel 4.1.1.6 und 4.1.1.7). Dies konnte auch in Life-Imaging Aufnahmen bestätigt werden, in denen HeLa-Zellen untersucht wurden, die mit einem CD9-eGFP-Vektor

persistent transfiziert worden waren und nachfolgend CD9 in ca. dreifacher Menge überexprimierten. Hier konnten bereits 30 min nach Zugabe von mAK K41 starke Veränderungen der CD9-Molekülverteilung an den Zellgrenzen beobachtet werden. Dabei akkumulierten die CD9-Moleküle im Zeitverlauf von bis zu 6 h immer stärker und bildeten CD9-Cluster von großem Ausmaß (Singethan et al., 2008). Somit ist die CD9-Aggregation ein hochdynamischer und schneller Prozess. Mit Hilfe einer Western-Blot Analyse wurde außerdem gezeigt, dass hier keine größeren Mengen an CD9-Molekülen 2 h bis 20 h nach Antikörperinkubation detektiert werden konnten und es sich somit nur um Umlagerungen der bereits vorhandenen CD9-Moleküle der Zelloberfläche oder aus intrazellulären Lagern handelt (siehe Kapitel 4.1.2).

Am Rasterelektronen- und konfokalen Mikroskop wurde schließlich sichtbar, dass diese Clusterstrukturen anfangs aus globulären Ausstülpungen bestehen, die sich aber nach 2 h bis zu 20 h zu einem starken Geflecht aus langen Mikrovilli bzw. mikrovilliartigen Ausstülpungen entwickeln, die von beiden Seiten der aneinander grenzenden Zellen gebildet werden (siehe Kapitel 4.1.1.7). Bereits nach 2 h sind die charakteristischen CD9-positiven Netzstrukturen zu erkennen. Diese werden aber im Verlauf der Zeit zu großen, reißverschlussähnlichen Strukturen, die aus CD9-positiven Mikrovilli bestehen. Der Mechanismus der Ausbildung CD9-angereicherter Membranen konnte allerdings nicht aufgeklärt werden. Möglicherweise modulieren die CD9-K41-Komplexe die Membran in globuläre Strukturen, so wie im konfokalen und Rasterelektronenmikroskop gezeigt, oder sie bilden zusammen mit dem Aktin-Zytoskelett eine Art Plattform für die Ausbildung von Mikrovilli. Da beobachtet werden konnte, dass F-Aktin zwischen den Netzstrukturen von allen untersuchten Zelltypen zu detektieren war und in engem Kontakt mit diesen stand, ist dies eine denkbare Erklärung (siehe Kapitel 4.1.1.6.1). Allerdings befindet sich Aktin nicht innerhalb der mikrovilliartigen Ausstülpungen. Zusätzlich konnte eine Ähnlichkeit der CD9-Strukturen mit den auf Aktin basierenden „Reißverschlussstrukturen“, die im Wundheilungsprozeß bei Epithelzellen beobachtet wurden (Jacinto et al., 2001), festgestellt werden. Zudem zeigte die Tatsache, dass durch die Behandlung mit Latrunculin B neben der Zerstörung des Aktin-Zytoskeletts auch die netzartigen Mikrovilli-Strukturen in Mitleidenschaft gezogen wurden und diese kollabierten, dass das Zytoskelett eine wichtige Rolle in der Aufrechterhaltung und der Bildung der CD9-Reißverschlussstrukturen spielt (siehe Kapitel 4.1.1.6.2). F-Aktin kann besonders auch im natürlichen Zustand der Zelle durch netzartige Anordnungen unterhalb der Plasmamembran und in Mikrovilli die äußere Form der Zelle stabilisieren (Kawai und Aumüller, 1998) – dies könnte also auch eine Aufgabe innerhalb der CD9-Netzstrukturen sein. Es ist außerdem bekannt, dass die Interaktion von Tetraspaninen mit verschiedenen Molekülen zur Bildung großer Membrankomplexe führt, die mit dem Zytoskelett assoziiert sind (Delaguillaumie et al., 2004).

Untersuchungen, die versuchten einen Zusammenhang zwischen Signalwegen der Rho-GTPasen oder der Signaltransduktion des Phosphatidylinositol-3-Kinase-Weges und der Induktion der CD9-Mikrovilliausstülpungen zu zeigen, waren nicht erfolgreich. Tetraspanine stehen über verschiedene Integrine mit Signalwegen im Zellinneren in Verbindung und können diese modulieren (Berditchevski und Odintsova, 1999; Levy and Shoham, 2005). So existiert schon lange die Vermutung, dass das Tetraspaninnetzwerk die Kommunikation zwischen den Zelloberflächenstimuli und den intrazellulären Signalwegen vermittelt, was den Zellen erlaubt, sich einer sich ständig ändernden Umgebung anzupassen (Levy und Shoham, 2005). Bisher ist jedoch noch nicht bekannt, wie genau Tetraspanine solche dynamischen, multiplen, aber doch sehr spezifischen Interaktionen steuern. Da CD9 mit GTP-bindenden Proteinen assoziiert (Seehafer und Shaw, 1991), entstand die Hypothese, dass durch die Interaktion mit β_1 -Integrin oder anderen Molekülen, diese aktiviert und somit der Signalweg der Rho-GTPasen stimuliert werden könnte, was die Ausbildung der CD9-Netzstrukturen zur Folge hätte (siehe Abbildung 5.1). Zusätzlich konnte in weiteren Publikationen die Assoziation von CD9 mit dem aktivierten β_1 -Integrin gezeigt werden, das die Migration in Wundheilungsprozessen, Zelladhäsion sowie die Signal-Transduktion bei der Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI-3-K)-Aktivierung vermittelt (Gutierrez-Lopez et al., 2003).

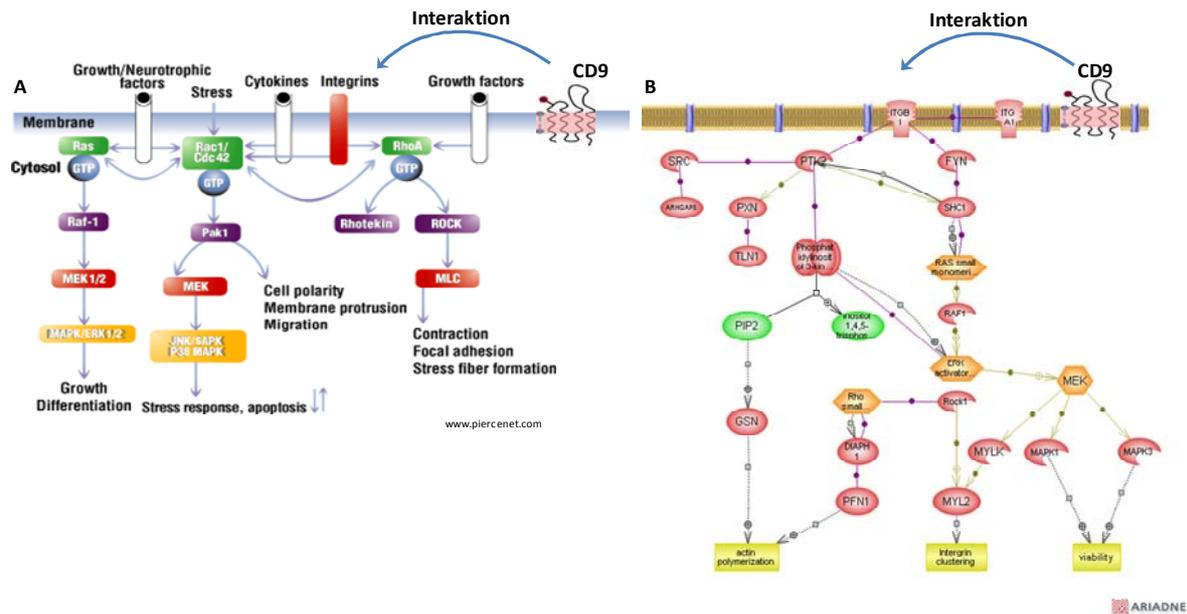


Abbildung 5.1: Hypothese zur Ausbildung der CD9-haltigen Netzstrukturen nach mAK K41-Behandlung durch den Rho-GTPasen- (A) oder den PI-3-K-Signalweg (B) (verändert nach www.piercenet.com und www.ariadnegenomics.com).

Rho-GTPasen sind wichtige Regulatoren der Signaltransduktion, da sie zelluläre Vorgänge, wie den Umbau des Aktinzytoskeletts, Zellpolarität oder die Zelladhäsion regulieren. Rho ist dabei für die Formierung von Stressfasern sowie für die Ausbildung von FAK (fokalen Adhäsionskontakten), Stellen an denen Stressfasern mittels Integrinen an die extrazelluläre Matrix gekoppelt sind, verantwortlich (Jaffe und Hall, 2005). Wird Rac hingegen aktiviert, kommt es zur Bildung von Lamellipodien, welche flache Ausstülpungen der Zellmembran darstellen. Sie befinden sich am Leitsaum der Membran und bestehen aus netzwerkartig polymerisiertem Aktin. Sie sind in der Lage, neue adhäsive Kontakte auszubilden und treiben die Zelle bei der Zellmigration voran. Cdc42 reguliert schließlich die Ausbildung von Filopodien, welche dünne längliche Ausstülpungen der Plasmamembran darstellen. Sie bestehen aus Bündeln von Aktinfilamenten, die durch aktinbindende Proteine vernetzt sind. Daher lag die Vermutung nahe, dass die beobachteten CD9-haltigen mikrovilliartigen Reißverschlussstrukturen durch diese Signalwege induziert werden. In Versuchen, in denen Inhibitoren gegen RhoA, Rac1 und Cdc42 gleichzeitig und vor der Inkubation mit mAK K41 eingesetzt wurden, konnten allerdings keine Auswirkungen auf die Bildung der Strukturen beobachtet werden (siehe Kapitel 4.1.3.3). Neueste Studien zeigten außerdem, dass CD9 die Expression der β_1 -ligandinduzierten Binding-Site (LIBS) hochreguliert und gemeinsam mit $\alpha_5\beta_1$ die CD9 geförderte Zellmigration und Motilität über einen PI-3-K-abhängigen Mechanismus erhöht (Kotha et al., 2008). Somit kann CD9 also den PI-3-K-Signalweg durch β_1 -Integrin aktivieren und so im Verlauf der Signalkaskade die Aktinpolymerisation induziert werden. Sollte Aktin also wirklich zur Bildung der CD9-Netzstruktur notwendig sein, was sich, wie bereits erwähnt, in Versuchen mit Latrunculin B bestätigte, wäre dies ein möglicher Weg der Ausbildung von CD9-Strukturen. In der vorliegenden Arbeit konnte zum einen gezeigt werden, dass das CD9-Molekül vor und nach der Inkubation mit β_1 -Integrinmolekülen in Kontakt steht. Dabei kolokalisieren β_1 -Integrine allerdings nur teilweise mit den CD9-Molekülen innerhalb der Netzstrukturen (siehe Kapitel 4.1.3.1). Zum anderen führte die gleichzeitige Inkubation von mAK K41-behandelten Zellen mit dem PI-3-Kinase-Inhibitor zu keinerlei Auswirkungen auf die Netzstrukturen. Wurde dieser vorinkubiert, konnten ebenfalls keine Veränderungen in der Bildung der CD9-Strukturen beobachtet werden, was bedeutet, dass sich die aufgestellten Hypothesen in Abbildung 5.1 nicht bestätigen konnten.

Interessanterweise ist CD9 auch auf mikrovillaren Membranen von Oocyten vermehrt vorhanden und reguliert dort ihre Form, Verteilung und das Clustern mit anderen Tetraspaninen wie $\alpha_6\beta_1$ -Integrin, so wie bisher unbekannt Proteinen, die in die Gametenfusion von Maus und Mensch involviert sind (Ziyta et al., 2006). Hierbei ist das Molekül essentiell für die Fusion von Spermium und Eizelle, wobei die genaue Funktion des CD9

bei diesem Vorgang noch nicht geklärt werden konnte (Miller et al., 2000; Le Naour et al., 2000). Neuste Erkenntnisse zeigen, dass CD9-reiche Vesikel von der Eizelle ausgeschüttet werden, um mit dem Spermium zu interagieren und die Fusion einzuleiten (Miyado et al., 2008). Außerdem stimuliert CD9 die Spermium-Ei-Fusion und CD9-Defizienz resultiert in der Infertilität der Weibchen (Miyado et al., 2000; Kaji et al., 2000). CD9 scheint aber auch die Zellfusion unter bestimmten Umständen zu inhibieren, wie dies für mononukleare Phagozyten gezeigt wurde (Takeda et al., 2003). Es ist an vielen zellulären Funktionen beteiligt, wie z. B. der Aktivierung, Adhäsion und Motilität von Zellen, der Zelldifferenzierung und an Zell-Zell-Interaktionen. Die durch Transfektion von Karzinoma-Zelllinien induzierte CD9-Expression unterdrückt die Motilität und Metastasierung (Ikeyama et al., 1993). Erst kürzlich konnte gezeigt werden, dass die CD9-Expression in Myelomzellen mit dem Krankheitsverlauf und dem Überleben von Multiplen-Myelom-Patienten (MM) korreliert: dabei kam es in Myelomzellen zur einer Downregulation von CD9, wohingegen Zellen in MM-Patienten, die an einer nichtaktiven Krankheit litten, CD9 exprimierten.

Die Induktion des CD9-Clusters durch Antikörper ist Epitop-abhängig, da nur gewisse Antikörper wie K41, MM2/57, ALB-6, und P1/33/2 funktionell sind, während andere CD9-Antikörper, sogar nach Kreuzvernetzung mit Sekundäntikörpern, nicht den gleichen Effekt induzieren können (siehe Kapitel 4.1.1.5 und 4.1.1.4). Der Antikörper mAK K41 erkennt ein Epitop, das reduzierenden Agentien gegenüber empfindlich ist, und in der großen extrazellulären Domäne (large extracellular Loop, LEL) des CD9-Moleküls (siehe Kapitel 4.1.1.3) lokalisiert ist. Die Tetraspaninmoleküle besitzen zwei unterschiedlich große extrazelluläre Schleifen, die kleine extrazelluläre Schleife (EC1) und die große EC2 (LEL; siehe Abbildung 5.2), die mit Integrinen und über verschiedene Signalwege mit dem Zellinneren in Kontakt steht.

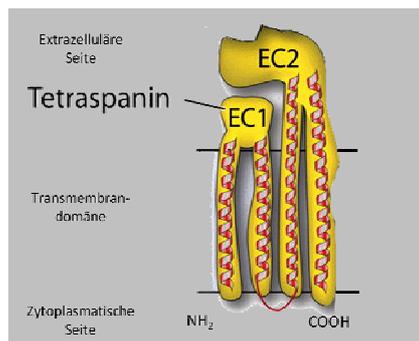


Abbildung 5.2: Schematische Struktur des CD9-Moleküls (nach Guangwei et al., JCB, 2006)

In den ausgeführten Versuchen konnte gezeigt werden, dass monovalente Fab-Fragmente von K41, trotz Quervernetzung durch sekundäre Antikörper, zwar die LEL von CD9 erkennen können, aber nicht den Effekt der Netzbildung induzieren. Dies lässt vermuten, dass die 3-dimensionale Struktur des bivalenten Antikörpers eine gewisse Distanz oder einen Interaktionswinkel gewährleistet, der durch die Fab-Fragmente nicht mehr vorhanden ist. Funktionelle Domänen und Epitope von CD9 wurden schon in früheren Veröffentlichungen untersucht (Levy und Shoham et al., 2005; Cook et al., 2002; Gutierrez-Lopez et al., 2003). Dabei konnte gezeigt werden, dass die LEL von CD9 ein Cystein-Cystein-Glycin-Motiv besitzt, das überwiegend mit assoziierten Transmembranrezeptoren, wie β 1-Integrin, interagiert und durch Aktivierungsstadien der assoziierten Integrine beeinflusst wird. Somit wäre es auf Grundlage der ermittelten Daten möglich, dass der bivalente mAK K41 aktiv ist, weil er zwei CD9-Moleküle verbindet und dabei ein Homodimer formt. Zusätzlich scheint diese Interaktion der LELs von CD9 mit mAK K41 zu bewirken, dass eine gewisse Konformation beibehalten wird. Da aber CD9-Homodimere bereits von neu synthetisierten Proteinen im Golgi zusammengebaut werden und diese eventuell als Basis für den Zusammenbau großer, aus vielen Komponenten zusammengesetzter Tetraspanin-Proteinkomplexe dienen (Kovalenko et al., 2004 und 2005), ist es vermutlich so, dass mAK K41 die bereits existierenden Homodimere kreuzvernetzt, um Tetramere oder Multimere zu bilden.

Weitere Untersuchungen sind erforderlich, um die strukturelle und funktionelle Konsequenz der K41-Bindung zu charakterisieren und dadurch mechanische Details der CD9-Aggregation und Bildung der mikrovilliartigen Reißverschlussstrukturen an den Zellkontaktstellen aufzudecken. Die kausale Beziehung zwischen der

Aggregation und der Bildung der mikrovilliähnlichen Ausstülpungen bleibt ungeklärt. CD9- und CD81-assoziierte Transmembranrezeptoren wie Ewi-Proteine, Mitglieder einer neuen Subfamilie der Ig-Superfamilie (Charrin et al., 2001; Stipp et al., 2001), könnten Aufschluss über die Mechanismen geben. Sie enthalten basisch geladene AS in der zytoplasmatischen Domäne, die mit den Ezrin-Radixin-Moesin-Proteinen (ERM) wechselwirken und als Verbindung zwischen den TEMs der Plasmamembran und dem Aktinzytoskelett dienen (Sala-Valdes et al., 2006). Dabei befindet sich Ezrin beispielsweise auf Mikrovilli, wobei sich Moesin überwiegend auf Filopodien aufhält und ebenso das Zytoskelett mit der Plasmamembran verbindet. In den vorliegenden Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass Ewi-F, was auf der Zelloberfläche exprimiert wird, nach der mAK K41-Behandlung mit CD9 an den Zellgrenzen in den Netzstrukturen kolokalisiert, was eventuell die Verbindung zum Zytoskelett darstellt (siehe Kapitel 4.1.3.1). Allerdings wurden nach Versuchen mit siRNA gegen Ewi-F und einer daraus folgenden starken Reduzierung der Ewi-F-Expression keine Auswirkungen auf die Ausbildung der mikrovilliartigen Reißverschlussstrukturen beobachtet (siehe Kapitel 4.1.3.2). Da es keinen Beweis dafür gibt, dass die Signaltransduktion bzw. das Umwandeln des Zytoskeletts für die CD9-Aggregation verantwortlich ist, ist die Antikörper-Interaktion an der Zelloberfläche vermutlich die treibende Kraft. Die hohen Antikörperkonzentrationen zwischen 5 - 15 µg/ml, die nötig sind, um das CD9-Clustern zu induzieren, unterstützen diese Vermutung.

Die Kolokalisation von CD9 mit anderen Tetraspaninmolekülen wie CD63, CD81 und CD82 und Proteinen, wie Ewi-F in K41-induzierten Clustern, lässt vermuten, dass dieser Antikörper die gesamte Organisation der Tetraspanine an der Oberfläche beeinflussen kann. In infizierten Zellen könnte das zu einer physikalischen Trennung der viralen Fusionsmaschinerie von den Zellkontaktbereichen oder zu einem Einschluss bzw. einer Aufnahme der Oberflächenproteine, abhängig vom benutzten Virus, führen. Die Zell-Zellfusion kann dabei in der Ausbildung von Riesenzellen enden, wie das in vivo während einer MV-Infektion beobachtet werden kann, oder sie ist auf eine Mikrofusionspore oder virologische Synapse beschränkt. Da Viren in ihrem Wirt meist den Weg der Zell-Zellfusion wählen, könnte CD9 einen wichtigen Platz in der viralen Pathogenese einnehmen.

Welche Rolle CD9 in der Virus-induzierten Fusion und in der viralen Ausbreitung von Zelle zu Zelle spielt, kann anhand einiger Beispiele aufgezählt werden. Interessanterweise wurden verschiedene Effekte für Antikörper gegen CD9, die die Zellfusion von CDV, MV und HIV-1 betreffen, beschrieben. Während einige Antikörper gegen CD81 und CD9 die HIV-induzierte Zellfusion erhöhen (Gordon-Alonso et al., 2006), zeigen andere Antikörper wie K41 die Hemmung beim HIV-Budding und Entlassen viraler Partikel. Aktuelle Studien zeigen, dass in T-Zellen und Makrophagen Tetraspanine am Zusammenbau und der Knospung von HIV an der Plasmamembran teilnehmen. Die in dieser Doktorarbeit erhaltenen Ergebnisse können sehr schön die spezifischen Effekte der CDV-induzierten Zellfusion zeigen. Zusätzlich konnte geklärt werden, warum mAK K41 keinen Effekt auf die MV-induzierte Zell-Zellfusion zu haben scheint. Die Daten zeigen, dass die strukturellen Veränderungen der Membran allein nicht die Virus-induzierte Zell-Zellfusion hemmen, da die Verlagerung des Virus entscheidend ist. So kommt es bei CDV zu einem Ausschluss der viralen Proteine von den CD9-Netzstrukturen an den Zellgrenzen, während MV-Proteine weiterhin an den Zellgrenzen und innerhalb der Netzstrukturen zu finden sind. Interessanterweise kolokalisieren bei CDV und MV die viralen Proteine im natürlichen, nicht K41-vorbehandeltem Stadium der Zelle mit den CD9-Molekülen (siehe Kapitel 4.1.4). In früheren Untersuchungen wurden chimäre CDV/MV-Oberflächenproteine verwendet und es konnte gezeigt werden, dass die viralen Hämagglutinine verantwortlich für den spezifischen Hemmungseffekt der Zell-Zellfusion sind (Singethan et al., 2006). Nachdem die viralen Hämagglutinine nicht direkt mit CD9 interagieren (Löffler et al., 1997) ist es vorstellbar, dass die zellulären Rezeptoren (CD46 für MV und unbekannt für CDV) eine wichtige und entscheidende Rolle bei der Vermittlung der beschriebenen Vorgänge spielen. So könnte die Exklusion der viralen CDV-Proteine von den Zellgrenzen, wo die zellulären Rezeptoren zu finden sind, durch die beschriebenen mikrovilliartigen Reißverschlussstrukturen verhindert werden. Andererseits könnte auch die Verdrängung der zellulären Rezeptoren durch die Bildung der CD9-Strukturen ein Grund für die Hemmung der Zell-Zellfusion sein.

Die Ergebnisse dieser Untersuchungen unterstreichen die Relevanz von CD9 für gesunde und pathogene Zellfusionsprozesse und könnten neue Strategien eröffnen, um die Zell-Zell-Verbreitung oder das Entlassen spezifischer Viren zu beeinflussen.

Im zweiten Teil dieser Doktorarbeit wurde ein Testsystem für die Untersuchung inhibitorischer Moleküle gegen die Paramyxovirus-Fusion etabliert.

Der zweite Schritt eines viralen Zyklus nach der Rezeptor-Interaktion stellt die Fusion von Zellmembran mit der Wirtszellmembran dar. Um eine Virus-Zellfusion oder eine Zell-Zellfusion zu induzieren, sind zwei Oberflächenproteine der Paramyxoviren notwendig und ausreichend: das F- und H-Protein bei MV und CDV bzw. das F- und G-Protein bei NiV. Dabei ist das F-Protein für die Fusion nach der Interaktion des H- bzw. G-Proteins mit dem zellulären Rezeptor verantwortlich (Dutch et al., 2000; Morrison, 2003) und der Mechanismus der Fusion in mehrere Ereignisse unterteilt. Nach der Aktivierung wird das Paramyxovirus F-Protein einer starken strukturellen Umordnung von einer hochenergetischen Konformation vor der Fusion zu einer niederenergetischen Haarnadelschleifenstruktur am Ende des Fusionsvorganges unterzogen (Lamb et al., 2006). Dabei wird die virale und zelluläre oder nur die zellulären Membranen benachbarter Zellen zusammengezogen, wobei diese fusionieren, was es dem Virus erlaubt in die Zelle einzudringen oder sich von Zelle zu Zelle auszubreiten. In diesem Prozess spielen zwei Heptad-repeat-Regionen (HRA und HRB), die gemeinsam einen Teil der F-Proteinstruktur bilden, eine wichtige Rolle, deren Auf- und Umbau stark mit der Membranfusion verknüpft ist (Baker et al., 1999). Der zentrale Vorgang bei den irreversiblen Proteinfaltungsprozessen ist folglich die Umordnung der HRA-Regionen von einer gefalteten, gefederten Form zu einer gespulten coiled-coil Struktur. HRA-Regionen helfen dem Fusionspeptid sich bis zur Aktivierung seitlich des Moleküls zu positionieren. Dabei werden zuerst Wechselwirkungen innerhalb des Fusionsproteins der Heptad-repeat-Region B (Stiel-Region; HRB oder HR2) mit der entsprechenden Domäne der Kopfregion, in der sich auch die Heptad-repeat-Region A (Kopf-Region; HRA oder HR1) befindet, aufgehoben (siehe Abbildung 5.3). Aus dieser offenen Konformation der drei Helices von HRB wird durch weitere Umstrukturierungen des Proteins die Ausbildung einer Vorläufer-Haarnadelstruktur von HRA favorisiert, die damit das Fusionspeptid in Kontakt mit der Zellmembran bringt und somit dessen Penetration realisiert. Des Weiteren führt die Annäherung der beiden haarnadelförmigen Domänen von HRA und HRB dazu, dass sich auch das Transmembranpeptid in der Virusmembran und das Fusionspeptid in der Wirtszellmembran annähern, was letztendlich zur tatsächlichen Fusion führt. Im Post-Fusionszustand ist die Membranverschmelzung schließlich vollendet und das F-Protein liegt in der 6-Helix-Bündel-Konformation (6HB) vor (siehe Abbildung 5.3).

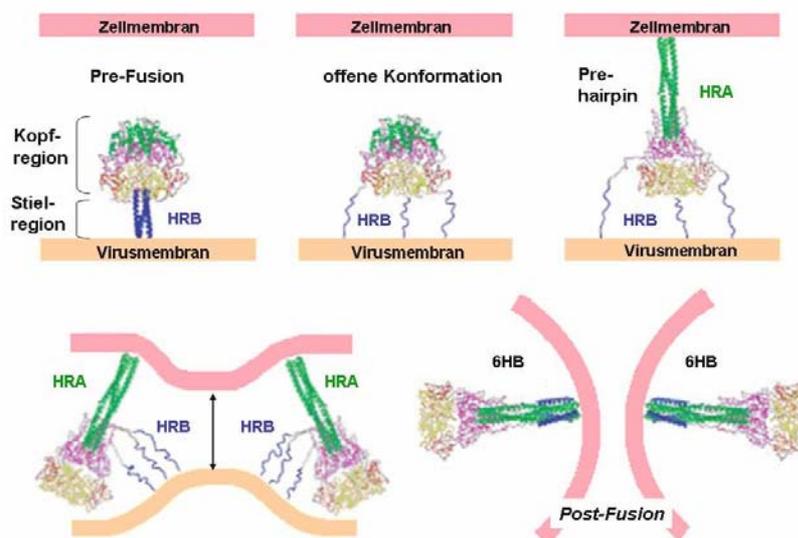


Abbildung 5.3: Modell der Membranfusion von Virus und Wirtszelle (modifiziert nach Yin et al., 2006). Umlagerung des F-Proteins zur energetisch günstigen Post-Fusionskonformation des 6HB aus sechs α -Helices durch die schrittweisen Konformationsänderungen der HRA- und HRB-Regionen.

Während des gesamten Fusionsprozesses werden die HR-Regionen schrittweise immer wieder exponiert bzw. umgefaltet. Da die Adsorption und Penetration des Virus Schlüsselschritte in der viralen Infektion sind, stellen gerade solche Fusionsintermediate potentielle Ziele zur Inhibitorentwicklung dar. Daher wurden Peptide, die die HRA- und HRB-Regionen imitieren, als Inhibitoren der F-vermittelten Membranfusion (Bossart et al., 2005; Lambert et al., 1996; Russell et al., 2001) entwickelt, wie beispielsweise Substanzen gegen das HIV Typ1 gp41-Protein (Chan et al., 1997; He et al., 2003). Dabei binden HRA-abstammende Substanzen vermutlich in einem frühen Stadium eines F-Proteinintermediats, während HRB-abstammende Substanzen die HRA-Prehairpin-Intermediate binden (Russell et al., 2001 und 2003). In beiden Fällen verhindert die Interaktion der von den Heptad-repeat-Regionen abstammenden Substanzen mit der komplementären HR-Region des F-Proteins die Bildung der Haarnadelstruktur, die für die Membranfusion essentiell ist (Melikyan et al., 2000; Paterson et al., 1993). HRB-abstammende Peptide sind meist kürzer, löslicher und ca. 1.000 Mal wirksamer als HRA-abstammende Peptide (Eckert und Kim, 2001). Deshalb wird in antiviralen Strategien oft auf HRB-imitierende Peptide zurückgegriffen oder auf kleine Moleküle, die die HRA-Region im coiled-coil Haarnadelschleifen-Intermediat angreifen und daher ebenso wirksam sind. Da Peptide aber meist schwer zu lösen bzw. aufzureinigen sind, werden verstärkte Bemühungen zu nicht-peptidischen, kleinen, leicht zu synthetisierenden Molekülen unternommen, die über eine gute Löslichkeit und Stabilität verfügen sollen.

Dabei gibt es für die Entwicklung solcher viraler Penetrationsinhibitoren meist zwei prinzipielle Ansatzpunkte, wobei die einen mit dem Virus-Rezeptor bzw. dem Co-Rezeptor direkt interagieren (HIV-Inhibitor BMS-378806; Rusconi et al., 2007; Review) und sich in deren Bindungstasche einlagern oder solche, die mit unterschiedlichen Stadien des Fusionsproteins interagieren. Diese unterteilen sich in Inhibitoren, die die ablaufenden Konformationsänderungen in frühen Stadien der Fusion stören oder unterbinden (MV: OX-1, AS-48; Plemper et al., 2005) oder die Ausbildung der 6HB-Struktur in einem späten Stadium des Fusionsprozesses verhindern oder destabilisieren (HIV: T-20; Qureshi et al., 1990). Somit kann mit dem Einsatz entsprechend geeigneter Peptide der Fusionsvorgang in verschiedenen Stadien und auf unterschiedlichen Ebenen inhibiert werden. Werden HRA-abgeleitete Substanzen in einem frühen Fusionsstadium verwendet, interagieren diese mit den vorhandenen HRB-Domänen. In einem späteren Stadium hingegen können durch die Gabe von HRA- bzw. HRB-abgeleiteten Substanzen durch Interferenz mit den entsprechenden Zielstrukturen die Konformationsänderungen und so die Funktionsfähigkeit des Fusionsproteins unterbunden werden. Ebenso gibt es spezielle peptidische Strukturen (z. B. Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH), die vermutlich in der Lage sind, sich in die Membran der Zielzelle zu integrieren und so die Einlagerung des Fusionspeptides abzuwenden. Zum anderen können in High-throughput-screenings (HTS) Verbindungen gegen nicht-attenuierte MV-WT-Stämme und deren verschiedenen Phasen im viralen Zyklus, die sich vom viralen Eintritt zum Zusammenbau des Viruspartikels erstrecken, untersucht werden (Yoon et al., 2008).

Basierend auf der strukturellen Ähnlichkeit von F-Proteinen der Paramyxoviren wurden drei veröffentlichte Masern-Virus-Inhibitoren verwendet, um diese als Grundlage für ein virtuelles Screening des MDL Drug Data Reports (2005) zu nutzen. Dabei handelte es sich um die Substanzen Ox-1, AM-2 und AS-48 (Plemper et al., 2004 und 2005). Nach einer 3-D Suche mit dem Programm OpenEye ROCS, das auf der Darstellung von molekularen Oberflächen für die schnelle Überlagerung von Molekülen nach Gauß beruht, konnte eine Grundsubstanz ermittelt werden, die von der molekularen Form und dem Pharmakophor eine starke Ähnlichkeit mit den zuvor erwähnten Inhibitoren aufwies (Zusammenarbeit mit K.Baumann, Technische Universität, Braunschweig und U.Holzgrabe, Pharmazie, Würzburg). Dabei handelte es sich um ein β -Ketocarbonsäureamid, was als wichtiges Strukturelement für die antivirale Wirkung ein 4-Chinolon-3-carboxamid-Derivat besitzt. Diese wurden am Institut für Pharmazie an der Universität Würzburg als Gerüst für das Design einer Bibliothek von Substanzen genutzt, um in Fusions-Assays mit MV, CDV und NiV untersucht zu werden (siehe Abbildung 5.4).

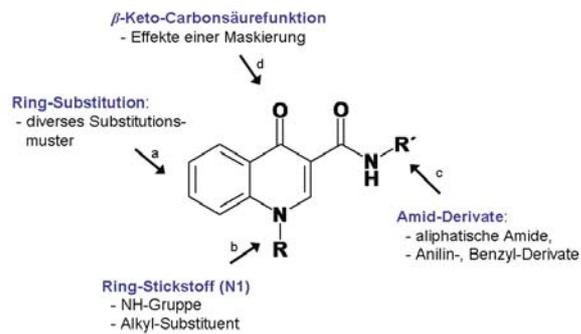


Abbildung 5.4: Übersicht über die Basisstruktur des 4-Chinolone-3-carboxamid-Derivats und die vorgenommenen Strukturvariationen zur Erzeugung einer Substanzbibliothek.

In den vorliegenden Untersuchungen wurden folglich Verbindungen der Chinolon-Substanzgruppe untersucht, die mit der Bindungstasche der HRA-Region wechselwirken. Chinolone sind bereits als Verbindungen bekannt, die beispielsweise die DNA-Topoisomerasen angreifen und chemisch mit der Substanzklasse der Antibiotika verwandt sind. Sie kamen bisher nur für die Hemmung bakterieller Reproduktion zum Einsatz, wo sie beispielsweise das für Bakterien essentielle negative Supercoiling der DNA verhindern. So konnte das Medikament Chloroquin entwickelt werden, das zur Behandlung und Vorbeugung schon seit den 50er Jahren gegen Malaria eingesetzt wird. Die nach der Synthese erhaltenen Substanzen mit verschiedenen Substitutionen, basierend auf dem 4-Chinolone-3-carboxamid-Derivat (Übersicht siehe Tabelle 4.2.1), sowie weitere Verbindungen wurden schließlich im Rahmen dieser Doktorarbeit in MV- und CDV-Fusions-Assays getestet und letztlich auf den NiV-Fusions-Assay übertragen. Da die kleinen Inhibitormoleküle vor ihrem Einsatz auf ihre Verträglichkeit getestet wurden, konnte festgestellt werden, dass im Fall aller Chinolone, mit Ausnahme der GH-Substanzvarianten, die Zytotoxizität in Konzentrationen bis zu 4 μM sehr gering war (siehe Kapitel 4.2.1). Die GH-Substanzgruppe hingegen konnte auch in höheren Konzentrationen verwendet werden, da hier keine toxischen Auswirkungen auf die Zellen zu erkennen waren. Da die gesamten getesteten Substanzen vor der Erstellung dosisabhängiger Wirkungskurven in verschiedenen Konzentrationen zwischen 10 μM und 200 μM zur Einschätzung ihrer Hemmungsaktivität getestet worden waren, sind daher alle hier nicht erwähnten Komponenten inaktiv oder zytotoxisch.

Unter den aktivsten Inhibitoren gegen die pCG-CDV-F und -H sowie pCG-MV-F und -H induzierte Fusion waren QED15A - 12, QED6 - 8, QD2 - 3 und QED15B - 12 (siehe Kapitel 4.2.2 und 4.2.3). Letzere beiden zeigten in der CDV-induzierten Fusion in Transfektions-Assays allerdings nicht die gleiche inhibitorische Wirkung wie bei der MV-Fusion. Ungeachtet dessen waren die Maximalwerte der Inhibition von ca. 80 % mit QED6 - 8 bei der CDV-Transfektion und die von MV bei QD2 - 3 und QED6 - 8 bei knapp unter 80 % mit jeweils 4 μM unter dem Wert der Referenzsubstanz Ox-1, die ursprünglich als Basis zur Entwicklung der anderen Substanzen gedient hatte. Hier konnten im Fall der CDV-Transfektion eine Fusionsinhibition von 60 % und bei MV von knapp 80 % mit nur 1 μM erzielt werden. Somit war Ox-1 eindeutig die stärkste inhibitorische Substanz in CDV- als auch in MV-Transfektionen. Weiterhin wurde bei der Untersuchung der GH-Substanzen festgestellt, dass GH02 im Vergleich zu GH36 (die Referenzsubstanz AS-48) sowohl in CDV- als auch in MV-Transfektions-Assays stärkere Inhibition zeigen konnte, allerdings in sehr hohen Konzentrationen von bis zu 20 μM ihr Inhibitionsmaximum von ca. 90 % erreichte. Da AS-48, eine Leitstruktur der dritten Generation von Ox-1 abstammend, zwar an Stabilität im Vergleich zu Ox-1 oder AM-4 (zweite Generation) gewann, dafür aber gleichzeitig auch an Aktivität verlor (Plemper et al., 2005), ist dies eine durchaus plausible Erklärung für die recht niedrige Hemmungsaktivität bei geringeren Konzentrationen. In Immunfluoreszenzfärbungen konnten die Ergebnisse der dosisabhängigen Wirkungskurven bestätigt werden (siehe Kapitel 4.2.2.2 und 4.3.2.2). Die Daten konnten teilweise für infektiöses Virus bestätigt werden, da die als bisher wirksam eingestuft Inhibitoren in Infektions-Assays untersucht wurden. So konnten für die CDV-Infektion QED15B - 12 und QED6 - 8 mit 4 μM eine Hemmung von knapp 60 - 70 % induzieren, wobei Referenzsubstanz 1 (Ox-1) mit einer Konzentration von nur 1 μM dieselbe Inhibition verursachen konnte. Hier ist zu beobachten, dass bei der CDV-Infektion so wie bei beiden Ansätzen mit MV-Edm und MV-WT (IC323) Ox-1 als die am besten hemmende Verbindung getestet wurde, wobei diese hier noch in Konzentrationen von 2 μM eingesetzt werden konnte ohne, wie bisher im

Transfektions-System, toxisch zu wirken. Dies könnte mit dem Zusammenspiel von Transfektionsreagenz und Ox-1 im Zusammenhang stehen, was in Transfektions-Assays in Kombination wohl zu einer erhöhten Toxizität führen kann. Da das Transfektionsreagenz alleine in Zusammenhang mit DMSO bereits als verträglich für die Zellen getestet wurde, konnte diese Möglichkeit für den Grund der Zelltoxizität ausgeschlossen werden (siehe Abbildung 4.2.1.1). Weiterhin war bei MV-Edm-Infektionen und MV-WT (IC323)-Infektionen QED15B - 12 der beste Inhibitor, während in letzterer ebenfalls QED6 - 8 als inhibierende Verbindung gegen die Fusion des MV-WT ihre Wirkung entfalten konnte. Abschließend ist zu sagen, dass sich die Ergebnisse der Transfektionen zum größten Teil in den Infektionen bestätigten und die Substanzen QED15B - 12 und QED6 - 8 neben der am besten wirkenden, bereits veröffentlichten Ox-1-Verbindung die CDV- und MV-Fusion inhibieren konnten.

Basierend auf den Untersuchungen der MV- und CDV-Fusion konnten die nun bereits als wirksam getesteten Verbindungen in der Nipah-Virus-induzierten Fusion eingesetzt werden. Hierbei waren QED15B - 12 und QED15A - 12 die am stärksten fusionsinhibierenden Substanzen (siehe Abbildung 5.5) so wie QD2 - 3 und QED6 - 8 Inhibitoren, die im mittleren Bereich ihr Wirkungsspektrum hatten (ca. 50 % Inhibition). Somit konnten die Ergebnisse aus den bisherigen Untersuchungen der anderen Paramyxoviren bestätigt werden, allerdings mit der Ausnahme, dass Ox-1 hier in niedrigen Konzentrationen bis zu 1 μM keinen Effekt auf die Nipah-Fusion hatte.

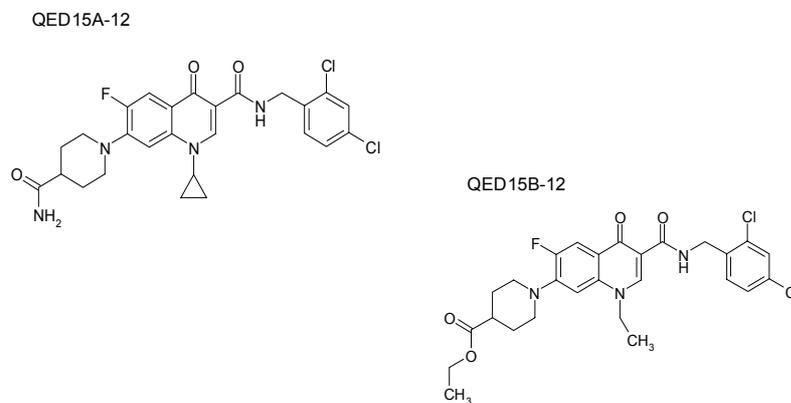


Abbildung 5.5: Die 4-Chinolon-3-carboxamid-Derivate QED15A - 12 und QED15B - 12 sind die stärksten Inhibitoren der Nipah-Fusion.

Schließlich wurden in Immunfluoreszenzfärbungen die Ergebnisse bestätigt (siehe Kapitel 4.2.4.2) und in Infektions-Assays die Inhibitoren auf ihre Aktivität unter Bedingungen getestet, die eher dem natürlichen Zustand entsprechen. Dabei bestätigte sich, dass QED15B - 12 so wie QED15A - 12 die am stärksten wirkenden Inhibitoren mit einer Fusionsinhibition von bis zu knapp 70 % waren. Ebenfalls zu bemerken ist, dass Ref1 (Ox-1) in der Infektion wiederum in höheren Konzentrationen eingesetzt werden konnte, was zur Folge hatte, dass sich auch hier die Aktivität der Verbindung bestätigte. Diese konnte, so wie die Chinolone QED15B - 12 und QED15A - 12, in Konzentrationen von 4 μM ihre Hemmungseffekte gegen die Nipah-Virus Fusion entfalten. Sie war aber nicht, wie in allen anderen Versuchen gezeigt, in niedrigen Konzentrationen der bessere Inhibitor, da diese Eigenschaft eindeutig den Chinolon-Derivaten zugesprochen werden konnte (siehe Kapitel 4.2.4.3). Die GH-Substanzen zeigten in Transfektions-Assays im Vergleich keine Inhibition der Vektor-induzierten NiV-Fusion und wurden daher nicht in den aufwändigen Infektions-Assays unter BSL-4-Bedingungen getestet.

In einem von der Kristallstruktur des Newcastle-Disease-Virus (NDV) abgeleiteten Homologiemodell des Masern-Fusionsproteins konnte eine potentielle Bindetasche im unteren Bereich der Kopfregion für MV identifiziert werden (Plempner et al., 2004; siehe Abbildung 5.6). Nach weiteren Untersuchungen zeigte sich, dass die beteiligten Aminosäuren, insbesondere Valin (V94), durch gegenseitige Wechselwirkungen entscheidend in die Konformationsänderungen eingebunden und so direkt an der Virus-Penetration in die Wirtszelle beteiligt sind. Als folgerichtig erwies sich auch, dass bereits der Austausch einzelner Aminosäuren, wodurch die Ladungs- bzw. Elektronendichteverteilung innerhalb der Bindetasche verändert wurde, zu einem starken Einfluss auf die Fusionsaktivität der entsprechenden Mutanten führte (Plempner et al., 2004). Somit stellte diese Mikrodomäne ein geeignetes potentielles Ziel für kleine, nicht-peptidische Wirkstoffe dar.

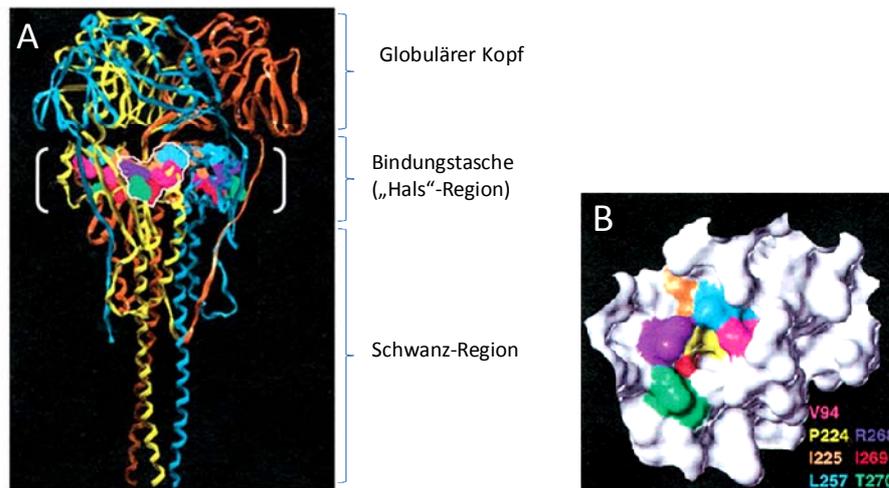


Abbildung 5.6: (A) Darstellung der Struktur des Fusionsproteins der Paramyxoviren (Homologie-Modell von NDV) mit Bindungstasche. (B) Detailansicht und Lage der Bindungstasche, die aus den Aminosäuren V94, P224, R268, I225, I269, L257, T270 der Heptad-repeat-Regionen (HR) gebildet wird (modifiziert nach Plemper et al., 2004).

Im Laufe der Substanzuntersuchungen wurde ebenfalls eine Bindungstasche für das Nipah-Virus aufgedeckt (Xu et al., 2008) (siehe Abbildung 5.6). Hierbei handelte es sich um die Kristallstruktur des postfunktionalen coiled-coil Trimers von NiV, die genutzt werden konnte, um die Bindungsweise für die biologisch aktive Substanzgruppe der Chinolone an der Technischen Universität Braunschweig untersuchen zu lassen. Dabei wurde die Übergangskonformation von HRA und HRB analysiert, die für die Interaktion beider Regionen als essentiell betrachtet wird. Hier wurden hydrophobe Wechselwirkungen zwischen den Aminosäuren I474, L481 und V484 in der HRB-Region und den korrespondierenden hydrophoben Taschen der HRA aufgedeckt. Diese interagieren im Fusionsprozess miteinander und machen diesen als solchen erst möglich, was auch schon in vorherigen Untersuchungen festgestellt worden war (Cianci et al., 2005). Schließlich wird die korrespondierende Region des HRA (graue Oberfläche) als Bindungstasche für den anschließenden Interaktions-Prozess mit HRB verwendet (grüne Struktur siehe Abbildung 5.7 A). Ferner konnte gezeigt werden, dass die wirksame Substanz QED15A - 12 in der Nipah-Fusion hervorragend mit der Bindungstasche von HRA interagieren kann (5.7 B). Speziell der substituierte Fluorophenylester ersetzt AS I474 in der großen hydrophoben Bindungsstelle, der Cyclopropylrest stellt einen bioisosterischen Ersatz für AS L481 dar und das Piperidin ersetzt sehr effektiv AS V484. Im Vergleich dazu zeigt der Inhibitor QED6 - 11, der auch in die Bindungstasche passt, allerdings kleiner ist und eine andere Geometrie besitzt, dass er sich der hydrophoben Bindungstasche nicht so gut zuwenden kann (5.7 C). Alle anderen Substanzen interagieren kaum oder gar nicht mit der Bindungstasche, da sie alle keinen gesättigten Heterozyklus an Position 7 besitzen.

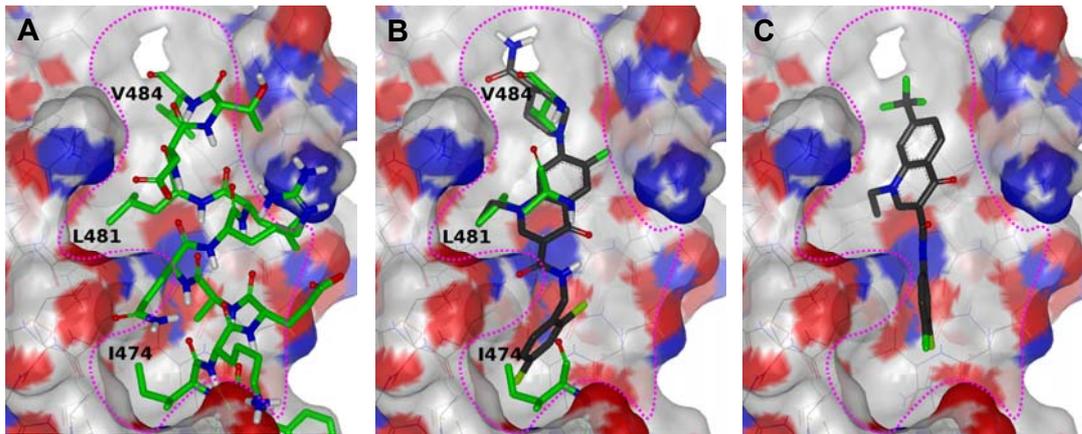


Abbildung 5.7: (A) Essentielle hydrophobe Interaktionen zwischen HRB (grün) und HRA (graue Oberfläche). Das Binden der Aminosäuren I474, L481 und V484 in den hydrophoben Regionen von HRA (rote Bereiche) ist für die NiV-Fusion notwendig. (B) Vorhergesagte strukturelle Bindungsweise von QED15A - 12 in die Bindungstasche des NiV F-Proteins. Die Seitenketten stellen eine bioisosterische Stellvertretung der HRB-Aminosäuren (grün) dar, die für die Wechselwirkung von HRA- und HRB-Regionen essentiell sind. (C) Vorhersage der Bindungsweise der nicht-hemmenden Substanz QED6 - 11. Wegen der starken Bindung des Trifluormethyl-Restes in der oberen hydrophoben Region (V484) kann die untere hydrophobe Seite (I474) nicht gebunden werden. (Modell der Bindungstasche basiert auf Kristallstruktur nach Xu et al., 2008).

Das Unterbinden der Verschmelzung von Virus- und Wirtszelle bietet somit einen attraktiven Ansatzpunkt zur Entwicklung kleiner Moleküle zum Eingriff in die primären Infektionsschritte von Viren. Inhibitoren gegen die Membranfusion, die die Virusreplikation blocken können, konnten bereits als klinische Mittel zum Einsatz kommen. So konnte das aus der HRB-Region abstammende Peptid des HIV gp41-Proteins (T-20, Enfuvirtide) erfolgreich als erster HIV-Fusionsinhibitor (Fuzeon®) und als medikamentöse Behandlung in Kombination mit anderen Therapien gegen HIV eingesetzt werden (Greenberg et al., 2004). T-20 verhindert das Eindringen bzw. die Membranverschmelzung, indem er die Aktivität der HRB-Region imitiert und somit kompetitiv die zweite Heptad-repeat-Region HRA bindet. So stört dieser Inhibitor die Interaktion zwischen HRA und HRB, die absolut notwendig für die Konformationsänderungen des Fusionsproteins und somit für den gesamten Fusionsprozess sind. HRB-abstammende Moleküle können die Virus- Zellmembranfusion blockieren, indem sie das HRA coiled-coil-Pre-Haarnadelschleifenintermediat des F-Proteins binden und so die Ausbildung der fusogenen Haarnadelschleife verhindern (Russell et al., 2003). Ein kleines Molekül, das entworfen wurde, um in der Proteinmulde der HRA coiled-coil-Region zu binden, inhibiert beispielsweise die Replikation des respiratorischen Syncytial-Virus (RSV; Cianci et al., 2004). Werden verschiedene konservative Mutationen in den Seitenketten der HR-Regionen eingefügt, kann das Virus trotzdem noch eine effiziente Virusreplikation und Membranfusion induzieren (Luque und Russell, 2007). Wenn das der Fall ist, können Resistenzen gegenüber diesen Mutationen in der HRA-Region des F-Proteins auftreten, wie diese beispielsweise beim gp41-Protein nach T-20-Behandlung aufgetreten sind (Lu et al., 2004; Reeves et al., 2005). Obwohl der Mechanismus der Resistenzen bisher noch nicht geklärt ist, ist dies ein Punkt, der in dem etablierten Projekt noch zu untersuchen bleibt.

Normalerweise inhibieren HR-abstammende Moleküle speziell nur die Membranfusion, die durch das F-Protein vermittelt wird, aus dessen Strukturen sie abgeleitet wurden (Lamb et al., 2001). Allerdings wurde auch schon die Inhibition von stark verwandten F-Proteinen gezeigt (Bossart et al., 2005) und ein HRB-abstammendes Peptid des humanen Parainfluenzavirus Typ 3 (hPIV3) konnte als Inhibitor gegen die Hendra-Virus-Fusion eingesetzt werden (Porotto et al., 2006). Dabei ist der Mechanismus der Kreuzreaktivität allerdings bisher ungeklärt. In den vorliegenden Untersuchungen konnte dennoch gezeigt werden, dass Moleküle wie QED15B - 12 und QED15A - 12 oder QED6 - 8 und QD2 - 3, die sich in der MV- und CDV-induzierten Fusion teilweise als sehr wirksam herausstellten, auch zum Teil auf die NiV-Fusion wirken konnten. Somit könnte die Basisstruktur der

Chinolone nicht nur für die Weiterentwicklung der NiV-Inhibitoren genutzt werden, sondern auch die Grundlage für Untersuchungen bei anderen Paramyxoviren bilden.

Der Vergleich von NiV- mit auf MV- bzw. CDV-basierenden Zellfusionsexperimenten deckte zum einen auf, dass Ox-1 ein MV-spezifischer Inhibitor ist, der auch bei CDV seine hemmende Wirkung entfalten kann, während QED15A - 12 und QED15B - 12 sehr NiV-spezifische Inhibitoren sind. Hingegen konnte QED6 - 8 alle drei Virustypen und QD2 - 3 Nipah- und Masernviren mit einer mittleren Effizienz hemmen. Um die präsentierten Daten unter möglichst „natürlichen Umständen“ zu untersuchen, wurden diese Hemmstoffe in Infektions-Assays getestet, wobei gezeigt werden konnte, dass die inhibitorische Aktivität der Verbindungen ebenfalls im Kontext mit dem kompletten infektiösen Virus besteht. Abschließend ist festzustellen, dass diese Studie der kleinen Inhibitormoleküle eine Klasse von vielversprechenden Chinolon-Derivaten hervorbrachte, die in die Bindungstasche des Nipah-Virus passen und so die NiV-induzierte Fusion inhibieren können (Niedermeier S. und Singethan K. et al. 2008, zur Veröffentlichung eingereicht).

Im dritten Teil der vorliegenden Untersuchungen sollten gegen die Dengue-Virus-Infektion entwickelten Peptide auf ihre Fähigkeit zur Inhibition getestet werden, wobei dazu die Etablierung eines Virus-Zell-Aufnahmetests Voraussetzung war. Da keine spezifische Therapie gegen DENV existiert und eine Erkrankung mit DENV nicht vor einer Neuinfektion mit anderen Serotypen schützt (siehe Kapitel 1.3, Antibody dependent enhancement), war es bisher nicht möglich, erfolgreiche Impfstoffe gegen DENV zu entwickeln. Daher ist die Entwicklung von Therapeutika auf Basis von Inhibitoren umso bedeutsamer.

Virale Fusionsproteine vermitteln den Zelleintritt, indem sie verschiedene Konformationsänderungen bewerkstelligen, die anschließend zur Fusion der viralen mit der zellulären Membran führen. Dabei besitzen Klasse I-Fusionsproteine, wie die der Paramyxoviren oder des HI-Virus, zwei α -Helices, im Gegensatz zu den β -Faltblattstrukturen von Klasse II-Fusionsproteinen von Flavi- und Alphaviren. Für die Inhibition der strukturellen Umlagerung von Fusionsproteinen der Klasse I wurden beispielsweise Peptide entwickelt, die, wie schon erwähnt, Teile der α -Helices imitierten und so die Infektion verhindern konnten (Qureshi et al., 1990). Zusätzlich wurden auch N- und C-Helix-Peptide gegen das HIV-Fusionspeptid gp41 entwickelt (Wild et al., 1994; Wild et al., 1993). Obwohl beträchtliche Unterschiede zu den Fusionsproteinen der Klasse II, zu denen das DENV-E-Protein gehört, bestehen, wurde bestätigt, dass auch diese Proteine während der Membranfusion starken Konformationsänderungen unterliegen. Dabei konnte gezeigt werden, dass Peptide, die Teile der Fusionsproteine imitieren, wie DN59 gegen DENV oder WN83 gegen das West-Nil-Virus, die Virusfusion im Anfangsstadium inhibieren und somit zu der Entwicklung antiviraler Agentien führen könnten (Hrobowski et al., 2005). DN59 ist ein 33 AS langes Peptid und stammt aus der Stammdomäne von DENV, während WN83 die WNV Domäne IIb des E-Fusionsproteins imitiert. Sie wechselwirken mit der Struktur der E-Proteine und deren Konformationsintermediaten oder mit den Stadien, die für die Interaktion mit der Membran verantwortlich sind, sie inhibieren somit den Fusionsprozess. Deshalb sollten auf Basis des bereits veröffentlichten DN59-Inhibitors (Hrobowski et al., 2005) kleine Peptide synthetisiert werden, die eine Hemmung der DENV-Aufnahme möglich machen könnten.

Weiterhin sollten nach Etablierung eines geeigneten Testsystems Moleküle entwickelt werden, die in die bereits durch Strukturanalysen des Dengue-Virus-Hüllproteins postulierte Bindungstasche für das kleine Molekül n-Octyl-b-D-glucoside passen und somit ebenso die DENV-Fusion hemmen (Modis et al., 2003). Diese beiden Synthesestrategien sollten verfolgt werden, um Peptide gegen das Hüllprotein zu entwickeln. Da bisher überwiegend nur die Stadien der flaviviralen und alphaviralen Oberflächenproteine vor der Fusion untersucht wurden (Lescar et al., 2001; Rey et al., 1995; Li et al., 2008), gibt es wenig Informationen über die Konformationsänderungen nach dem Beginn des Fusionsprozesses (Modis et al., 2003; Yu et al., 2008). Hierzu sollten auch strukturelle Gemeinsamkeiten sowie Informationen über verschiedene Konformationsstadien der viralen Fusionsproteine der Klasse II genutzt werden, um kleine Moleküle als Inhibitoren verwandter Viren zunächst zu entwickeln und dann in Zellkultur zu testen (Kuhn et al., 2002; Zhang et al., 2004). So wie in Klasse I-Fusionsproteinen führt auch in Klasse II-Proteinen eine proteolytische Spaltung (vom prM- zum M-Protein) zu

einem reifen Virion, mit einem für die Fusion bereiten Fusionsprotein in einer metastabilen Konformation. Somit ist es durchaus denkbar, dass auch hier verschiedene Konformationsintermediate im Fusionsprozess das E-Protein zu einem möglichen Ziel für inhibitorische Peptide machen. So wurden für die bevorstehenden Untersuchungen am Institut für Pharmazie in Würzburg die ersten Peptide Den01, Den02, Den03 und Den04a synthetisiert (Zusammenarbeit mit Prof. Dr. T. Schirmeister). Hierzu wurden Teile des Inhibitors DN59 in verschiedene kleine Peptide unterteilt, wobei Verbindungen entstanden, die stückchenweise auf der AS-Sequenz des DN59-Inhibitors beruhten (siehe Kapitel 2.11). Da Flaviviren durch Rezeptor-vermittelte pH-induzierte (im Endosom) Fusion der viralen mit der zellulären Membran aufgenommen werden (Schneider-Schaulies et al., 2000) und das Arbeiten mit infektiösen Dengue-Viren nur unter BSL-3-Bedingungen erfolgen kann, sollte eine Möglichkeit gefunden werden, die Hemmung des Fusionsproteins E in einem anderen Testsystem als dem der DENV-vermittelten Membranfusion bei der Virusinfektion zu untersuchen. Daher war das Ziel, ein auf pseudotypisierten Retroviren etabliertes Testsystem zu entwickeln, bei dem die Hemmung der Transduktion der DENV-E-tragenden retroviralen Partikel durch Verwendung der zur Verfügung stehenden Inhibitoren gezeigt werden sollte. So sollte das Hüllprotein des Dengue-Virus, das allein für die Fusion der Wirtszell- mit der Virusmembran verantwortlich ist, und ein zusätzliches Indikatorgen in die Kulturzellen eingebracht werden, um auf diese Weise unter BSL-2-Bedingungen arbeiten zu können.

Da berichtet wurde, dass von Zellen, die mit Vektoren transfiziert wurden, die das prM+E-Protein des Tick-Borne-Encephalitis-Virus tragen, Virus-ähnliche Partikel sezerniert werden (Gehrke et al., 2003), sollte ein ähnlicher Ansatz auch für das Dengue-Virus erfolgen. Daher sollten Expressionsplasmide hergestellt werden, die für prM+E codierten und diese wiederum in einem System mit Plasmiden eingesetzt werden, die für gagpol des murinen Leukämievirus (pHit60, Soneoka et al., 1995) und für ein LTR-flankiertes eGFP kodieren. Würden auf diese Weise pseudotypisierte retrovirale Partikel entstehen, die das Hüllprotein des DENV und ein verkürztes retrovirales Genom mit der Expressionskassette eGFP enthalten, dann würden diese durch die „Pseudo-Virus-Zellmembranfusion“, also der Transduktion, von Kulturzellen aufgenommen, eGFP synthetisiert und die Zellen so fluoreszieren. Die Wirkung potentieller Inhibitoren könnte so unter BSL-2-Bedingungen untersucht und durch die Messung der fluoreszierenden transduzierten Zellen quantifiziert werden. Das pseudotypisierte Virus selbst ist, aufgrund des gekürzten Genoms, nicht weiter vermehrungsfähig, ermöglicht aber das Screening vieler potentieller Inhibitoren der Virus-Zellfusion.

Daher bestanden die Ansätze zur Etablierung des pseudotypisierten retroviralen Testsystems zuerst einmal darin, Plasmide herzustellen, die die Hüllproteine der DENV 2 - 4-Proteine exprimieren, um diese somit als Expressionsvektoren für die Herstellung pseudotypisierter retroviraler DENV-Partikel nutzbar zu machen. Dazu wurden die Sequenzen der prM+E-Proteine von DENV 2 - 4 aus pMT-Vektoren ausgeschnitten und in pCG-Vektoren kloniert. Der Grund für die Verwendung der prM-Sequenz bestand darin, dass die carboxyterminale Region des E-Proteins nur mit Hilfe des M-Proteins in die Membran verankert werden kann. Zusätzlich hat das M-Protein die Aufgabe eines Art Platzhalters, der für die korrekte Faltung des Proteins verantwortlich ist. Nach mehrfachen Klonierungsansätzen war es möglich, von DENV 3 das E-Protein in einen pCG-Klon zu erhalten, der das E-Protein auf den transfizierten Zellen exprimiert (siehe Kapitel 4.3.1.5). Während die Expression des DENV 3 E-Proteins in Vero-Zellen eher im niedrigeren Bereich lag, konnte die Expression in 293T-Zellen nach Immunfluoreszenzfärbungen als ausreichend für den Versuch, pseudotypisierte retrovirale Partikel zu erstellen, eingeschätzt werden. Daher sollte dieses Expressionsplasmid nun in 293T-Zellen für die ersten Ansätze zur Bildung pseudotypisierter retroviraler DENV-Partikel genutzt werden, doch es zeigte sich, dass es nach Transfektion nicht möglich war, solche Partikel in geeigneter Menge zu erhalten, um das Testsystem etablieren zu können. Die niedrigen Werte der erhaltenen Partikelüberstände nach Titration, in denen transduzierte Zellen nur in Verdünnungen von 1 : 5 nachzuweisen waren, wiesen darauf hin, dass der Zusammenbau und Einbau des Indikatorgenoms in die Partikel im Vergleich zu den Kontrollen nicht funktionierte. Denn in Kontrollen, in denen die mit MV-F- und -H-tragenden Partikel transduziert worden waren, konnten in Verdünnungen von bis zu 1 : 3125 erfolgreich transduzierte Zellen beobachtet werden bzw. mit dem ursprünglichen Plasmid aus dem retroviralen Testsystem, das für VSV-G codiert, in Verdünnungen von bis zu 10^7 . In Ansätzen

hingegen, in denen die verwendeten Ausgangsplasmide pMT-DV2 - 4 verwendet wurden, die jedoch keine nachweisbare E-Proteinexpression gezeigt hatten (siehe Kapitel 4.3.2), konnten ebenfalls vereinzelt transduzierte Zellen bis zu Verdünnungen von 1 : 25 beobachtet werden (siehe Kapitel 4.3.2.). Ob diese eventuell durch pseudotypisierte retrovirale Partikel entstanden waren, die nur das eGFP-Plasmid aufgenommen hatten, ist auszuschließen, da die Partikel ohne Oberflächenprotein theoretisch keine Zellen transduzieren können bzw. erst gar nicht entstehen. Warum es also zu diesem Phänomen kam, ist bisher unklar. Fest steht, dass mit unveränderten DENV-Hüllproteinen die Etablierung dieses Testsystems nicht möglich war.

Daher wurden drei weitere Klonierungsschritte unternommen, um eine bessere Expression des DENV 3 E-Proteins bzw. Verpackung des Indikatorgenoms zu erreichen. Hierzu wurden verschiedenen Strategien verfolgt, die es ermöglichen sollten, durch Kombinationen verschiedener Teile des E-Proteins herauszufinden, welche Regionen für die Expression des E-Proteins essentiell waren und dies somit zu einer erhöhten Expression führen könnte. Dazu wurden verschiedene Teile der prM+E-Gensequenz, wie die N-terminale (bis zum C-Terminus) oder C-terminale (nur der C-Terminus) Region oder die gesamte Gensequenz, in unterschiedlichen Ligationsansätzen verwendet. Ferner wurden die Sequenzen mit Primern isoliert, die eine zusätzliche Kozak-Konsensus-Sequenz (gccRccAUGG; R=G/A; G=austauschbar) enthielten, um die Translation des Proteins durch die Ribosomen nach der Ligation mit dem Vektor zu verstärken. So wurde in der Generierung des pCG-eGFP-DV3-E-N Klons 2 der N-terminale Teil der prM+E-Gensequenz (ohne die AS, die die carboxyterminale letzte Transmembrandomäne des E-Proteins bilden) aus dem pCG-DV3-Vektor isoliert und in den pCG-eGFP-Vektor kloniert, der mit Hilfe des Markergens den Erfolg der Klonierung bestätigen sollte. Schließlich konnte in Transfektionen getestet werden, dass zum einen eine Expression von GFP darauf hinwies, dass der Vektor zwar funktionell war und das GFP-Protein auch erfolgreich durch Ribosomen translatiert werden konnte, allerdings zum anderen keine E-Proteinexpression nach Immunfluoreszenzfärbungen nachzuweisen war (siehe Kapitel 4.3.3.2). Des Weiteren wurde eine Klonierungsstrategie verfolgt, bei der die N-terminale prM+E-Gensequenz aus dem pCG-DV3-Vektor sowie die zytoplasmatische Region von MuLV-ENV isoliert und in den pCG-eGFP-Vektor kloniert wurden. Da das ursprüngliche E-Protein von Dengue nur eine aus 3 AS bestehende zytoplasmatische Region besitzt, bestand die Hypothese, dass eventuell durch die Zugabe einer zytoplasmatischen Region des MuLV-ENV-Gens die Verpackung in pseudotypisierte retrovirale Partikel bzw. die Expression des E-Proteins verbessert werden könnte. So konnten pCG-eGFP-DV3-E-Tri Klone 3, 6 und 14 erfolgreich ligiert, jedoch in späteren Untersuchungen keine E-Expression beobachtet werden. Ungeachtet dessen war wiederum eine erfolgreiche GFP-Expression zu beobachten, was auf eine fehlerfreie Translation der Vektorsequenzen deutete (siehe Kapitel 4.3.3.2). In einem letzten Klonierungsansatz wurde der N-terminale prM+E-Gensequenzbereich ohne die C-terminale Region, mit der MuLV-ENV Schwanzregion zusammen in den pCG-eGFP Vektor eingebracht und nach Erhalt des pCG-eGFP-DV3-E-Bi Klone 7 und 21 die E-Expression getestet. Auch hier konnte keine Expression des E-Proteins festgestellt werden, allerdings wiederum die erfolgreiche Translation der eGFP-Sequenz bestätigt werden (siehe Kapitel 4.3.3.2).

Abschließend konnte folglich in keinem der Verbesserungsversuche zur Erhöhung der E-Expression bzw. Verpackung in pseudotypisierte retrovirale Partikel ein Erfolg verzeichnet werden. In einem letzten Klonierungsversuch wurden schließlich die E-Proteinsequenzen aus dem Virusgenom neu isoliert, wozu zuerst die Dengue-Virus Infektion im BSL-3-Labor erfolgreich etabliert werden musste (siehe Kapitel 4.3.5). Hier wurde nun allein die E-Gensequenz ausgewählt, um eine weitere Möglichkeit zu testen, die E-Proteine in pCG-eGFP-Vektoren zur Expression zu bringen. Da die Vektoren nachweislich sehr gute eGFP-Expression zeigten, wurde von einem Wechsel des Vektors abgesehen. Diese Klonierung konnte jedoch auch durch mehrfache Wiederholungen der Isolation der E-Gensequenz und der Ligationsansätze nicht zum Erfolg gebracht werden.

Somit blieb nur noch die Möglichkeit, die bereits vorhandenen putativen Inhibitorpeptide gegen die Dengue-Virusaufnahme in Infektions-Assays mit infektiösem DENV unter BSL-3-Bedingungen zu testen (siehe Kapitel 4.3.5). Hierbei konnten die Peptide gleichzeitig für 1 h zugegeben werden und drei Tage später, was sich in der Etablierung der DENV-Infektionen als ausreichend erwiesen hatte, um die ersten Infektionsherde zu beobachten, in einer Immunfluoreszenz gefärbt werden. Dabei sollte die Reduktion der Foci zeigen, ob ein

Inhibitor seine Wirkung gegen die DENV-Infektion entfalten konnte oder nicht. So wurden die auf DN59 beruhenden Peptide Den01 - Den04a untersucht, die, wie bereits erwähnt, aus Teilen der Aminosäuresequenz von DN59 bestehen (siehe Kapitel 2.11). Dabei ist die zugehörige Ankerregion, die von diesen Peptiden imitiert wird, in einem Stadium vor der Fusion exponiert und bei allen Flaviviren hochkonserviert (Hrobowski et al., 2005).

So wurden in den vorliegenden Untersuchungen die Peptide Den01 und Den02 als infektionshemmende Peptide ermittelt, was durch Immunfluoreszenzfärbungen sichtbar gemacht werden konnte (siehe Kapitel 4.3.5). Dabei wurde die Ausbildung von DENV-Infektionsherden um insgesamt ca. 60 % gehemmt, was durch Analysen im Fluoreszenzreader quantifiziert werden konnte. DN59 konnte in Konzentrationen von ca. 10 μM die Virus-Zellfusion in Plaque-Assays bis zu 50 % ($\text{IC}_{50} = 10 \mu\text{M}$) hemmen. In der vorliegenden Arbeit konnte die Bildung der viralen Foci mit Den01 in einer Konzentration von ca. 1 μM bis 2 μM um etwa 50 % ($\text{IC}_{50} = 1 - 2 \mu\text{M}$) gehemmt werden, was deutlich niedriger war, als bei DN59. Daher scheint die Wechselwirkung der Regionen im vorderen Bereich der Ankerregion der Stammdomäne wesentlich wichtiger zu sein, als die der anderen Regionen, da hier durch Zugabe der Peptide Den03 und Den04a keine Auswirkungen auf die Bildung der viralen Infektionsherde (Foci) zu beobachten war. Mehrere Studien zeigten, dass Klasse II-Proteine nach der Einlagerung des Fusionspeptids ähnlichen Konformationsänderungen unterzogen werden wie Klasse I-Proteine. Bei Proteinen der Klasse I finden vermutlich Wechselwirkungen zwischen der Stamm-Domäne und den Domänen I, II und /oder III statt (Modis et al., 2003, Zhang et al., 2004; Kuhn et al., 2002). So werden die virale und zelluläre Membran durch Interaktionen der Stammdomäne des E-Proteins mit anderen Domänen innerhalb des Proteins in räumliche Nähe zueinander gebracht, bis die Fusion stattfindet. So könnten Peptide, die aus Abschnitten der Aminosäuresequenz der E-Proteine bestehen und diese nachahmen, vermutlich mit diesen wechselwirken und so ihre Funktion sowie die Umlagerung stören, was schließlich die virale Fusion unterbindet. Dies könnte für die Peptide Den01 und Den02 ein denkbarer Wirkungsmechanismus sein, da sie, wie schon erwähnt, aus Teilabschnitten der Aminosäuresequenz des E-Proteins der Stammdomäne bestehen. Dabei zeigte sich allerdings, dass sie im Gegensatz zu DN59, der die Dengue-Infektion bis zu insgesamt 99 % hemmen konnte, eine Infektionshemmung von ca. 60 % zeigten (siehe Kapitel 4.3.5). Da die letzten Abschnitte des DN59-Peptids, die durch Den03 und Den04a vertreten waren, zu keiner Hemmung der DENV-Infektion führten, scheinen für den starken Hemmungseffekt nur die beiden vorderen Teilbereiche der AS-Sequenz wichtig zu sein, die durch Den01 und Den02 abgedeckt wurden.

Abschließend ist zu sagen, dass die Etablierung der Zellkultur von Dengue-Infektionen im BSL-3-Labor erfolgreich war. Weiterhin konnte ein DENV 3 E-Protein-exprimierender Vektor hergestellt werden, der allerdings nicht für die Etablierung des angestrebten Testsystems für die Herstellung pseudotypisierter retroviraler Partikel funktionell war. Trotz verschiedener Modifikationen des E-Proteins konnten keine pseudotypisierten Viren werden. Letztlich mussten die synthetisierten Peptide Den01, Den02, Den03 und Den04a in einem Infektions-Assay unter BSL-3-Bedingungen getestet werden, wobei Den01 und Den02 als am erfolgreichsten wirksame Inhibitoren gegen die DENV 2 Virus-Zellfusion ermittelt werden konnten. In Weiterentwicklungen auf Grundlage dieser Verbindungen könnten weitere wirksame Verbindungen entstehen, die die Infektion aller Serotypen hemmen. So könnten sie eventuell als Breitspektrum-Inhibitoren wirken, da sie anders als DENV-Vakzine, die multivalent aufgrund des ADE-Phänomens sein müssen, gegen die hochkonservierten Regionen der Stammdomäne gerichtet sind. Weitere Studien sollten den exakten Mechanismus der Hemmung von Den01 und Den02 aufdecken und deren spezifischen Ort der Interaktion zeigen, was mit Hilfe eines molekularen Strukturmodells möglich sein sollte. Letztlich bleibt nach wie vor als Ziel die Etablierung eines pseudotypisierten retroviralen Testsystems, um Inhibitor-Untersuchungen mit Dengue zukünftig unter BSL-2-Bedingungen handhaben zu können und so weiterhin Inhibitoren für potentielle Medikamentenentwicklungen gegen eine schwere, sich weltweit stark ausbreitende Infektion zu untersuchen, gegen die es bisher weder wirksame Impfstoffe noch antivirale Agentien gibt.

6 Zusammenfassung

CD9 und andere Mitglieder der Tetraspaninfamilie sind an der strukturellen Organisation und der Plastizität der Plasmamembran beteiligt. Dabei inhibiert mAK K41, ein spezifischer CD9-Antikörper, die Hundestaupe-induzierte Zell-Zellfusion und die Virusfreisetzung, während die MV-induzierte Zell-Zellfusion nicht beeinflusst wird. So ist die extrazelluläre Domäne des Hämagglutinin-Proteins von CDV diejenige, die die Empfindlichkeit der Zell-Zellfusion gegenüber dem CD9-Antikörper verursacht, die aber selbst nicht an das CD9-Molekül bindet. Diese Erkenntnisse ließen vermuten, dass strukturelle Veränderungen an der Plasmamembran der Grund für die Hemmung sind bzw. räumliche Expressionsmuster des Rezeptors involviert sein könnten. In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass mAK K41 das Konformationsepitop der großen extrazellulären Domäne (LEL) von CD9 erkennt, die nachweislich über β 1-Integrin mit verschiedenen Signalwegen im Innern in Kontakt steht. Die Bindung dieser Domäne induziert folglich eine schnelle Umlagerung und ein Clustern der CD9-Moleküle bis zur Bildung von netzähnlichen Strukturen an den Kontaktstellen zweier Zellen. Durch konfokale und rasterelektronenmikroskopische Untersuchungen konnten mikrovilli-ähnliche Ausstülpungen aufgedeckt werden, die von beiden Seiten aneinander liegender Zellen gebildet werden. Nach einer Zeitspanne von 2 h bis 20 h bildeten diese CD9-haltigen Ausstülpungen feine, mehrere μ m lange Mikrovilli aus, die sich in einer Art Geflecht miteinander vernetzten und mikrovilli-artige Reißverschlussstrukturen bildeten. Weiterhin konnte eine starke Kolokalisierung des Ewi-F-Proteins vor und nach der Antikörperinkubation gezeigt werden, sowie eine partielle Kolokalisierung mit β 1-Integrin. Im Vergleich konnten MV-Proteine innerhalb der CD9-haltigen Netzstrukturen beobachtet werden, während CDV-Proteine komplett aus diesen ausgeschlossen wurden. Somit ist die Ausgrenzung der viralen Fusionsmaschinerie von CDV von den CD9-Clustern sowie die physikalische Trennung von den Zellkontakten wohl die Erklärung für die Inhibition der Virus-induzierten Zell-Zellfusion durch mAK K41. Da experimentell keine kausale Verbindung zwischen der Induktion der CD9-haltigen Cluster und bestimmten Signalwegen gezeigt werden und auch kein Beweis hervorgebracht werden konnte, dass die Grundlage der Netzstrukturen durch die Umlagerung des Zytoskeletts entsteht, scheint die Interaktion des Antikörper selbst die treibende Kraft für die Strukturbildung zu sein (Singethan et al., 2008). Zusammenfassend ist zu sagen, dass die Ergebnisse die Relevanz des CD9-Moleküls in gesunden und pathogenen Zell-Zellfusionsprozessen unterstreichen und eindeutig zeigen, dass CD9 die Zellfusion von CDV steuern kann, indem es den Zugang der Fusionsmaschinerie zu den Zellgrenzen reguliert.

Das Nipah-Virus (NiV) ist ein hochpathogenes Paramyxovirus, das in Schweinen eine Erkrankung des Respirationstrakts und in Menschen eine schwere fieberige Enzephalitis mit hohen Mortalitätsraten verursacht. Da es noch keine Vakzine bzw. antivirale Medikamente gegen diese Erkrankung gibt, war die Entwicklung kleiner inhibitorischer Moleküle notwendig. Für das Masern-Virus (MV) wurden bereits kleine Inhibitoren, wie Ox-1, AM-2 und AS-48 entwickelt, die in die Bindungstasche des MV F-Proteins passen und so die Membranfusion verhindern. Basierend auf struktureller Ähnlichkeiten der Paramyxovirus F-Proteine konnte ein Testsystem mit F- und H- oder G-exprimierenden Vektoren entwickelt werden, indem eine Gruppe von Chinolon-Derivaten sowie mehrere andere Substanzen auf ihre Fähigkeit untersucht wurden, die eine MV-, CDV- oder NiV-spezifische Fusion zu hemmen. Dazu wurde zuerst die Zytotoxizität aller Substanzen bewertet, um anschließend ihre Hemmungsaktivität in Zell-Zellfusion-Assays zu untersuchen. So inhibierten zwei Substanzen, QED15B - 12 und QED15A - 12, aus der Gruppe der Chinolon-Derivate die NiV-induzierte Synzytienbildung in Hüllprotein-Transfektions- und Infektions-Assays. Bei molekularen Untersuchungen der Bindungstasche des NiV F-Proteins wurde die hemmende Aktivität beider Chinolon-Derivate bestätigt. So konnte eine hervorragende Wechselwirkung und strukturelle Paßform für die Protein-Bindetasche identifiziert werden und deren Interaktion bewiesen werden. Somit konnte die Substanzklasse der Chinolone als Inhibitoren gegen die NiV-Fusion identifiziert und der Mechanismus der Interaktion mit der Bindetasche als Grund für die inhibierende Wirkung aufgeklärt werden (Niedermeier S. und Singethan K. et al., 2008 zur Veröffentlichung eingereicht). Dabei sind diese Chinolon-Derivate mit ihrer Struktur, die völlig verschieden von den meisten aktiven Molekülen gegen die Masern-induzierte Zellfusion sind, eine vielversprechende neue Verbindungsstruktur, auf der weitere Entwicklungen neuer Inhibitoren und antiviraler Agentien aufgebaut werden können.

Letztlich sollte ein Testsystem für Untersuchungen der Dengue-Virus Oberflächenprotein-induzierten Virus-Zellfusion etabliert werden, wobei pseudotypisierte retrovirale DENV E-tragende Partikel hergestellt werden sollten. Dadurch sollte ermöglicht werden, dass kleine Peptide sowie inhibitorische Moleküle gegen das E-Protein, das alleine für die Virus-Zellfusion verantwortlich ist, unter BSL-2-Bedingungen getestet werden können. Da es nicht sehr viele Informationen über Konformationsintermediate der Klasse II-Proteine gibt, zu denen das E-Protein gehört, sollten Ähnlichkeiten mit den Klasse I-Proteinen genutzt werden, um hemmende Peptide gegen den initialen Prozess der Infektion zu identifizieren. Obwohl die Klonierung des E-Proteins von DENV 3 in den pCG-Vektor zu einer sehr guten Expression in 293T-Zellen führte, konnte ein Testsystem zur Entwicklung pseudotypisierter DENV 3 E-Protein tragender Partikel nicht etabliert werden. Trotz verschiedener Klonierungsstrategien zur Modifikation des E-Proteins, führte keine davon zum Erfolg. So führte weder das Auswechseln der carboxyterminalen Region des E-Proteins gegen eine zytoplasmatische Region des MuLV, dem Virus, auf dem das retrovirale Testsystem basiert, noch das Entfernen des C-Terminus zu einer verbesserten Verpackung in pseudotypisierte Partikel. Weiterhin zeigte sich, dass weder das Inserieren von Kozak-Sequenzen zur Verbesserung der E-Protein-Translation noch das zusätzliche Inserieren der zytoplasmatischen Region von MuLV zu einer Verbesserung der Expression bzw. Verpackungsfähigkeit führte. Letztlich konnten die E-Proteinsequenzen nach einer erfolgreichen Etablierung der Dengue-Infektion unter BSL-3-Bedingungen effektiv aus dem Virusgenom aller vier Serotypen neu isoliert werden. Allerdings konnten keine weiteren Erfolge in der Klonierung der Fragmente in den gut exprimierenden eGFP-Vektor erzielt werden. Somit wurden die Peptide Den01, Den02, Den03 und Den04a in Infektions-Assays getestet. Dabei zeigte sich, dass Den01 und Den02 am erfolgreichsten die Dengue-Infektion inhibieren konnten ($IC_{50} = 1 - 2 \mu M$). Im Gegensatz dazu zeigte Den03 nur eine schwache Inhibition von insgesamt ca. 30 % (bei $10 \mu M$) und Den04a keine Hemmung. Da die Peptide alle von Teilen der Ankerregion der Stammdomäne des E-Proteins abstammten, sind weitere Untersuchungen notwendig, um den genauen Hemmungsmechanismus und die spezifische Interaktion mit dem viralen Zielprotein im molekularen Modell zu zeigen. Besonders die ersten Aminosäuren, die die Ankerregion bilden und durch die Peptide Den01 und Den02 vertreten sind, scheinen eine wichtige Rolle für die Virus-Fusion und den Fusionsprozess innerhalb dieser Region zu spielen. Im Gegensatz zu DENV-Vakzinen, die wegen des Effekts der Antikörper-abhängigen Verstärkung (ADE) multivalent sein müssen, sollten Peptide wie Den01 und Den02 eine Kreuzreaktivität mit anderen Serotypen zeigen, da sie gegen konservierte Regionen der Flavivirus-Oberflächenproteine synthetisiert wurden und somit generell reaktiv und effizient gegen alle Dengue-Virus-Serotypen wirken sollten, was noch in weiteren Analysen zu untersuchen bleibt.

7 Summary

Members of the tetraspanin family including CD9 contribute to the structural organization and plasticity of the plasma membrane. K41, a CD9-specific mAb, inhibits canine distemper virus (CDV) induced cell-to-cell fusion and virus release, whereas measles virus (MV) induced cell-to-cell fusion is not affected. The extracellular domain of the viral haemagglutinin (H) of CDV determines the susceptibility of cell-cell fusion to certain CD9-antibodies, however does not itself bind to CD9. This suggested that structural alterations of the plasma membrane influencing the activity and/or spatial expression pattern of receptors are involved. In the present thesis we found that K41, which recognizes a conformational epitope on the large extracellular loop (LEL) of CD9, induces rapid relocation and clustering of CD9 in net-like structures especially at contact areas between two cells. The high resolution analyses by confocal and electron microscope revealed that CD9 clustering is accompanied by the formation of microvilli-like protrusions that are formed from both sides of adjacent cell surfaces. After about 2 h to 20 h the protrusions are forming more and more structures like microvilli zippers. While the cellular CD9-associated protein EWI-F is co-clustering with CD9 at cell contact areas after and before mAb K41 treatment, the β 1-integrin can only partially be found within the CD9 structures built at the cell interfaces. In contrast viral proteins in infected cells were differentially affected by the treatment of mAb K41. While MV envelope proteins were detected within the microvilli zippers, the CDV proteins were displaced and excluded from CD9 clusters. The exclusion of the viral fusion machinery and its physical separation from cell contact areas explains the inhibition of virus-induced cell-cell fusion by K41. Since we have no experimental support that signal transduction and remodeling of the cytoskeleton may drive the clustering, it is more likely that the antibody interaction on the cell surface is the driving force (Singethan et al., 2008). Although it is known that LEL is interacting with β 1-Integrin and inducing signaling pathways within the cell, it was not possible to find any evidence for the involvement of any signaling pathway. The findings underscore the relevance of the tetraspanin CD9 for healthy and pathogenic cell-to-cell fusion processes and clearly show that CD9 can regulate cell-cell fusion by controlling the access of the fusion machinery of CDV to cell contact areas.

Nipah virus (NiV), a highly pathogenic paramyxovirus, causes a respiratory disease in pigs and severe febrile encephalitis in humans with high mortality rates. There is no vaccine and no antiviral treatment available until now. Small molecule inhibitors, like Ox-1, AM-2 or AS-48, fitting into a pocket of the measles virus (MV) F protein and preventing membrane fusion have been designed earlier. Based on the structural similarity of viral fusion (F) proteins within the family Paramyxoviridae, we tested a library of quinolone derivatives and several other small molecules in a NiV, CDV and MV envelope protein-based fusion assay. The cytotoxicity of all substances was evaluated and they were tested for their ability to inhibit cell-to-cell fusion induced by the three mentioned viruses. The most active molecules, QED15A-12 and QED15B-12, inhibiting the syncytium formation induced by transfection of pCz-CFG5-NiV-F and -G and infection with NiV, revealed an active quinolone-type compound structure, which is different from the most active molecules against MV induced cell fusion. In conclusion, this study revealed a class of promising compounds fitting into a protein cavity of the NiV F protein and inhibiting NiV-induced cell-cell fusion (Niedermeier S. and Singethan K. et al., 2008 submitted for publication).

Finally we had the aim to establish a test system for investigations of the Dengue-Virus envelope protein induced virus-cell fusion using DENV-E pseudotyped retroviral particles. This should open an experimental way to develop small inhibitory peptides and molecules against the Dengue E-protein, which mediates the fusion of the viral membrane with the cellular membrane, working under BSL-2 conditions. As there is not sufficient information about intermediate conformational stages of the class II fusion proteins during the fusion process, similarities to the class I proteins should help to develop highly active antiviral peptides inhibiting this process. Although cloning of DENV-3-E-cDNA in the pCG-eGFP vector lead to a high expression of the E-protein, the test system based on pseudotyped retroviral particles could not be established. Even though there were used several different modification strategies like exchanging 3' protein tails in order to get a protein with a tail of the envelope protein of MuLV, which should lead to a better packaging into the pseudotyped particle system based on MuLV, it was not possible to obtain pseudotyped particles. Other strategies like deleting parts of the

C-terminus or using Kozak-sequences for a better translation didn't reveal an improvement in E-protein expression. So as a last experiment we could successfully isolate new E-protein sequences from viral genomes, after having effectively established a Dengue-Virus infection in the BSL-3 laboratory. But the ligation of these isolates into the highly expressing pCG-eGFP-vector was not successful. Consequently we tested the potentially inhibitory peptides Den01, Den02, Den03 and Den04a under BSL-3 conditions in infection assays using the DENV serotype 2. We could observe that peptides Den01 and Den02 were successfully inhibiting the virus-induced fusion ($IC_{50} = 1 - 2 \mu M$), while Den03 only showed little inhibition (upt to 30 %) and Den04a did not inhibit the infection. As all peptides were developed by using parts of the amino acid sequence of the anchor region of the E-protein stem domain, further studies are needed to define the exact mechanism of inhibition of the DENV peptides and the specific location of their interaction with the viral target by using the molecular modeling system. As a result especially the first amino acids, which form the anchor region of the E-protein and are presented by the peptides Den01 and Den02, might play an important role for the fusion process. Unlike DENV vaccines, which must be multivalent because of the effect of antibody dependent enhancement, peptides like Den01 and Den02 targeting different conserved motifs of the flavivirus DENV 2 envelope protein should demonstrate cross-strain reactivity and efficacy for all Dengue serotypes, which still needs to be investigated in the course of thos project.

8 Abkürzungsverzeichnis

Abkürzung	Benennung	Abkürzung	Benennung
AK	Antikörper	m	milli
AS	Aminosäure	M	Molar
bp	Basenpaare	M-Protein	Membran-Protein
BSA	Bovines Serum Albumin	mAK	monoklonaler Antikörper
BVD	Bovine Virusdiarrhö	MEM	minimal essential medium
bzw.	beziehungsweise	MD-Virus	Mucosal disease Virus
C-Protein	Core-Protein	min	Minuten
C-Protein	Capsid-Protein	MOI	multiplicity of infection; infektiöse Dosis
ca.	zirca	mRNA	messenger-RNA
CDV	Hundestaupe-Virus, Canine Distemper Virus	MV	Masern-Virus
CPE	zytopathischer Effekt	MW	Molekulargewicht
DENV	Dengue-Virus	NiV	Nipah-Virus
d. h.	das heißt	NS	Nicht-Strukturproteine
DNA	Desoxyribonukleinsäure	PBS	Phosphat-gepufferte Salzlösung
dpi	Tage nach Infektion	PCR	Polymerase-Kettenreaktion
E-Protein	Envelope-Protein	PFA	Paraformaldehyd
ERM	Ezrin-Radixin-Moesin	prM	precursor M-Protein
Edm	Edmonston (Variante der MV-Vakzine)	®	eingetragenes Warenzeichen
ER	Endoplasmatisches Retikulum	REM	Rasterelektronenmikroskop
EtOH	Ethanol	RNA	Ribonukleinsäure
F-Protein	Fusionsprotein der Morbilliviren	RNP	Ribonukleoprotein-Komplex
FACS	fluorescence activated cell scanner;	rpm	Umdrehungen pro Minute
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat; Fluoreszenzfarbstoff	RT	Raumtemperatur
FKS	Fötales Kälberserum	SSPE	Subakute sklerosierende Panenzephalitis
g	Erdbeschleunigung	Tab.	Tabelle
H	Hämagglutinationsprotein der Morbilliviren	TM	Transmembran(-Protein)
h	Stunde	TM	Trademark
HIV	Humanes Immundefizienz Virus	TEM	Tetraspanin enriched microdomains
IF	Immunfluoreszenz	u. a.	unter anderem
Ig	Immunglobulin	ÜN	über Nacht
Kap.	Kapitel	Vol	Volumen
kb	Kilobasen	z. B.	zum Beispiel
kDa	Kilodalton	ZNS	Zentrales Nervensystem
μ	mikro	WT	Wild Typ

9 Literaturverzeichnis

A

- Aaby P, Samb B, Simondon F, Knudsen K, Seck AM, Bennett J, Whittle H (1993). Divergent mortality for male and female recipients of low-titer and high-titer measles vaccines in rural Senegal. *Am J Epidemiol.* 138 (9): 746-55.
- Advances in Virus Research, Volume 64, Virus Structure and Assembly, Polly Roy, (2005), Science; Academic Press.
- Anderson WF. Prospects for human gene therapy. *Science.* (1984); 226(4673): 401 - 9.
- Anonymous. (1999a) Outbreak of Hendra-like virus- Malaysia and Singapore, 1998 - 1999. *MMWR-Morb-Mortal-Wkly-Rep.*, 48, 265 - 269.
- Anonymous. (1999b) Update: outbreak of Nipah virus- Malaysia and Singapore, 1998 - 1999. *MMWR-Morb-Mortal-Wkly-Rep.*, 48, 335 - 337.
- Anonymous. (2004) Person-to-person transmission of Nipah virus during outbreak in Fardpur District. *Health-Sci-Bull.*, 2, 5 - 9.
- Anton, E. S., M. Hadjiargyrou, P.H. Patterson, and W.D. Matthew. 1995. CD9 plays a role in Schwann cell migration in vitro. *J. Neurosci.* 15: 584 - 595.
- Appel, M. (1969). Pathogenesis of canine distemper. *Am. J. Vet. Res.* 30:1167 - 1182.
- Appel, M.J.G., and J.H. Gillespie. (1972). Canine distemper virus. *Virology Monographs* 11: 1 - 96.
- Axthelm, M.K. and Krakowa, S. (1987). Canine distemper virus: early blood-brain barrier lesion. *Acta Neuropathol.* 75: 27 - 33.
- Aylward, R. B., J. Clements, and J. M. Olive (1997). The impact of immunization control activities on measles outbreaks in middle and low income countries, *Int. J. Epidemiol.* 26: 662 - 669.
- Aziz, J., Olson, J, Lee, OB, Daniels, P, Adzhar, AB, Bunning, M, Sharihuddin Field, H, and Johara Hopper, P. (1999) Nipah virus infection of animals in Malaysia. *Abst. XIth Int. Cong. Virol., Sydney, Australia*, 38.

B

- Baker, K; Dutch, RE; Lamb, RA; Jardetzky, TS (1999). Structural basis for paramyxovirus-mediated membrane fusion. *Molecular Cell.* 3: 309 - 319.
- Baron M.D.; Wild-type Rinderpest virus uses SLAM (CD150) as its receptor; *Journal of General Virology* (2005), 86, 1753 - 1757.
- Baron, M. D. and Barrett, T. (2000) Rinderpest viruses lacking the C and V proteins show specific defects in growth and transcription of viral RNAs. *J Virol*, 74: 2603 - 2611.
- Barrett T, Blixenkrone-Möller M, Di Guardo G., Domingo M., Duignan P., Hall A., Mamaev L., Osterhaus A. D (1995). Morbilliviruses in aquatic mammals: report on round table discussion. *Vet Microbiol.* 44: 261 - 5.
- Barrett T, Rima B. K. Molecular biology of morbillivirus diseases of marine mammals. In *Molecular and Cellular Biology of Marine Mammals* (1st edn), Pfeuffer J (2002). Krieger Publishing Company: Malabar, FL: 161 - 172.
- Bell, J. R.; Kinney, R. M.; Trent, D. W.; Lenches, E. M.; Dalgarno, L.; Strauss, J. H. (1985): Amino-terminal amino acid sequences of structural proteins of three flaviviruses. *Virology.* 143: 224 - 229.
- Bellini WJ, Rota JS, Lowe LE, Katz RS, Dyken PR, Zaki SR, Shieh WJ, Rota PA (2005): Subacute sclerosing panencephalitis: more cases of this fatal disease are prevented by measles immunization than was previously recognized. *J Infect Dis.* 192(10): 1686 - 93.
- Bellini, W. J.; Englund, G.; Rozenblatt, S.; Arnheiter, H.; Richardson, C. D. (1985): Measles virus P gene codes for two proteins. *Journal of virology.* 53: 908 - 919.
- Bellini, W. J.; Rota, J. S.; Rota, P. A. (1994): *Virology of measles virus*, Teil 170.
- Berditchevski, F. and Odintsova, E. 1999. Characterization of Integrin - Tetraspanin Adhesion Complexes: Role of Tetraspanins in Integrin Signaling. *J. Cell Biol.* 146: 477 - 492.
- Bergelson, J. M., Chan, M., Solomon, K. R., John, N. F. St., Lin, H. and Finberg, R. W. (1994). Decay-accelerating factor (CD55), a glycosylphosphatidylinositol-anchored complement regulatory protein is a receptor for several echoviruses. *PNAS* 91: 6245.
- Bergelson, J. M., Shepley, M. P., Chan, B. M., Hemler, M. E., and Finberg, R. W. (1993). Identification of the integrin VLA-2 as a receptor for echovirus 1. *Science* 255: 1718.

- Billeter, M. A., and Cattaneo, R. (1991). Molecular biology of defective measles viruses persisting in the human central nervous system. In: Kingsbury D. (ed) *The paramyxoviruses*. New York: Plenum: 323 - 245.
- Blixenkrone-Möller, M., Svansson, V., Have, P., Orvell, C., Appel, M., Pedersen, I. R., Dietz, H. H. & Henriksen, P. (1993). Studies on manifestations of canine distemper virus infection in an urban dog population. *Veterinary Microbiology*, 37: 163 - 173.
- Blumberg, B. M., Leppert, M. and Kolakofsky, D. (1981). Interaction of VSV leader RNA and nucleocapsidprotein may control VSV genome replication. *Cell*, 23: 837 - 845.
- Bosch, B. J.; van der Zee, R; de Haan, CA; Rottier, PJ. (2003). The coronavirus spike protein is a class I virus fusion protein: structural and functional characterization of the fusion core complex. *J Virol*, 77: 8801 - 8811.
- Bossart K. N., Mungall BA, Cramer G, Wang LF, Eaton BT, Broder CC. (2005) Inhibition of Henipavirus fusion and infection by heptad-derived peptides of the Nipah virus fusion glycoprotein. *J Virol*, 2: 57.
- Bossart, K. N., Wang, L. F., Eaton, B.T. and Broder, C.C. (2001) Functional expression and membrane fusion tropism of the envelope glycoproteins of Hendra virus. *Virology*, 290, 121 - 135.
- Bossart, K. N., Wang, L. F., Flora, M. N., Chua, K. B., Lam, S. K., Eaton, B. T. and Broder, C. C. (2002) Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the Nipah virus and Hendra virus envelope glycoproteins. *J Virol*, 76, 11186 - 11198.
- Boucheix, C, Thien Duc, G. H., Jasmin, C. and Rubinstein, E., (2001). *Tetraspanins and malignancy*. Expert Reviews in molecular medicine. Cambridge University Press.
- Boucheix, C., and E. Rubinstein (2001). Tetraspanins. *Cell Mol., Life Sci.*, 58: 1189 - 1205.
- Boussif O, Lezoualch F, Zanta MA, Mergny MD, Scherman D, Demeneix B, Behr JP. (1995). A versatile vector for gene and oligonucleotide transfer into cells in culture and in vivo: polyethylenimine. *Proc. Nat. USA*, 92: 7297 - 301.
- Bressanelli S., Stiasny K., Allison S. L., Stura E. A., Duquerroy S., Lescar J., Heinz F. X., Rey F. A. (2004). Structure of a flavivirus envelope glycoprotein in its low-pH-induced membrane fusion conformation. *EMBO J.*, 23: 728-38.
- Brun S., Solignat M., Gay B, Bernard E., Chaloin L., Fenard D., Devaux C., Chazal N., Briant L (2008). VSV-G pseudotyping rescues HIV-1 CA mutations that impair core assembly or stability. *Retrovirology*, 5: 57.
- Bultmann, H; Brandt, CR (2002). Peptides containing membrane-transiting motifs inhibit virus entry. *J Biol Chem.*, 277: 36018 - 36023.
- Burns, J. C.; Friedmann, T.; Driever, W.; Burrascano, M.; Yee, J. K. (1993): Vesicular stomatitis virus G glycoprotein pseudotyped retroviral vectors: concentration to very high titer and efficient gene transfer into mammalian and nonmammalian cells. *Proc.Nat. Academy of Sciences of the United States of America*, 17: 8033 - 8037.
- Butler, D. (2004). Fatal fruit bat virus sparks epidemics in southern Asia. *Nature*, 429: 7.

C

- Calain, P.; Roux, L. (1993): The rule of six, a basic feature for efficient replication of Sendai virus defective interfering RNA. *Journal of virology*, 8: 4822 - 4830.
- Calderon MG, Remorini P, Periolo O, Iglesias M, Mattion N, La Torre (2007). Detection by RT-PCR and genetic characterization of canine distemper virus from vaccinated and non-vaccinated dogs in Argentina. *J.Vet Microbiol.*, 125: 341 - 9.
- Carey L. Medin, Katherine A. Fitzgerald, and Alan L. Rothman (2005). Dengue Virus Nonstructural Protein NS5 Induces Interleukin-8 Transcription and Secretion; *J Virol.*, 79: 11053 - 11061.
- Carr, CM; Kim, PS (1993). A spring-loaded mechanism for the conformational change of influenza hemagglutinin. *Cell*. 73: 823 - 832.
- Cathomen, T.; Mrkic, B.; Spehner, D.; Drillien, R.; Naef, R.; Pavlovic, J. et al. (1998): A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain. *The EMBO Journal*, 17: 3899 - 3908.
- Catros-Quemener V, Bouet F, Genetet N (2003). Antitumor immunity and cellular cancer therapies *Med Sci (Paris)*. 19: 43 - 53.
- Cattaneo, R., Rebmann, G. Bacsko, K., ter Meulen, V., and Billeter, M.A., (1987). Altered ratios of measles virus transcripts in diseased human brains. *Virology* 160: 523 - 526.
- CDC; MMWR Morbidity and Mortality Weekly Report. Outbreak of Hendra-like virus--Malaysia and Singapore, 1998 - 1999. 48: 265 - 269.
- CDC; Progress in reducing measles mortality worldwide, 1999 - 2003. *MMWR* 2005; 54: 200 - 203.
- Chadha, M.S., Comer, J.A., Lowe, L., Rota, P.A., Rollin, P.E., Bellini, W.J., Ksiazek, T.G. and Mishra, A. (2006). Nipah virus-associated encephalitis outbreak, Siliguri, India. *Emerg Infect Dis*, 12, 235 - 240.

- Chambers, T J; Chang, S H; Galler, R; Rice, C M. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol.* 1990; 44: 649 - 688.
- Chan KW, Hsieh HH, Wang HC, Lee YJ, Sung MH, Wong ML, Hsu WL Identification, expression and antigenic analysis of recombinant hemagglutinin proteins of canine distemper virus; *J.Virology Methods* 2008 Nov 6.
- Chan, DC; Fass, D; Berger, JM; Kim, PS. Core structure of gp41 from the HIV envelope glycoprotein. *Cell.* 1997; 89: 26 - 273.
- Charrin S, Le Naour F, Oualid M, Billard M, Faure G, Hanash SM, Boucheix C, Rubinstein E. The major CD9 and CD81 molecular partner. Identification and characterization of the complexes. *J Biol Chem* 2001; 276 (17): 14329 - 14337.
- Chemical and Biological Weapons: Possession and Programs Past and Present", James Martin Center for Nonproliferation Studies, Middlebury College, April 9, 2002, accessed November 14, 2008.
- Chen Y, Maguire T, Hileman RE, Fromm JR, Esko JD, Linhardt RJ, Marks RM: Dengue virus infectivity depends on envelope protein binding to target cell heparan sulfate. *Nat Med* 1997, 3 (8): 866 - 871.
- Chen YC, Wang SY, King CC: Bacterial lipopolysaccharide inhibits dengue virus infection of primary human monocytes/macrophages by blockade of virus entry via a CD14-dependent mechanism. *J Virol* 1999, 73 (4): 2650 - 2657.
- Chernomordik LV, Frolov VA, Leikina E, Bronk P, Zimmerberg J. The pathway of membrane fusion catalyzed by influenza hemagglutinin: restriction of lipids, hemifusion, and lipidic fusion pore formation. *J Cell Biol.* 1998 Mar 23; 140 (6): 1369 - 82. PMID: 9508770.
- Chernomordik LV, Kozlov MM. Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem.* 2003; 72: 175 - 207. Review. PMID: 14527322.
- Cherpillod P, Tipold A, Griot-Wenk M, Cardozo C, Schmid I, Fatzer R, Schobesberger M, Zurbriggen R, Bruckner L, Roch F, Vandeveld M, Wittek R, Zurbriggen A. DNA vaccine encoding nucleocapsid and surface proteins of wild type canine distemper virus protects its natural host against distemper. *Vaccine.* 2000 Jul 1; 18 (26): 2927 - 36. PMID: 10825593.
- Choi, C. (2004) Nipah's return. The lethal "flying fox" virus may spread between people. *Sci Am*, 291, 21A, 22.
- Chong, H. T., Kamarulzaman, A., Tan, C. T., Goh, K. J., Thayaparan, T., Kunjapan, S. R., Chew, N. K., Chua, K. B. and Lam, S. K. (2001) Treatment of acute Nipah encephalitis with ribavirin. *Ann Neurol*, 49, 810 - 813.
- Chua, K. B., Bellini, W. J., Rota, P. A., Harcourt, B. H., Tamin, A., Lam, S. K., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Zaki, S. R., Shieh, W., Goldsmith, C. S., Gubler, D. J., Roehrig, J. T., Eaton, B., Gould, A. R., Olson, J., Field, H., Daniels, P., Ling, A. E., Peters, C. J., Anderson, L. J. and Mahy, B. W. (2000) Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science*, 288, 1432 - 1435.
- Chua, K. B., Goh, K. J., Wong, K. T., Kamarulzaman, A., Tan, P. S., Ksiazek, T. G., Zaki, S. R., Paul, G., Lam, S. K. and Tan, C. T. (1999) Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet*, 354, 1257 - 1259.
- Ciancanelli, M. J. and Basler, C. F. (2006) Mutation of YMYL in the Nipah virus matrix protein abrogates budding and alters subcellular localization. *J Virol*, 80, 12070 - 12078.
- Cianci C., D. R. Langley, D. D. Dischino, Y. Sun, K-L. Yu, A. Stanley, J. Roach, Z. Li, R. Dalterio, R. Colonno, N. A. Meanwell, M. Krystal, Targeting a binding pocket within the trimer-of-hairpins: small-molecule inhibition of viral fusion, *Proc Natl Acad Sci USA* 2004, 101, 15046 - 15051.
- Cianci, C., N. Meanwell, and M. Krystal. 2005. Antiviral activity and molecular mechanism of an orally active respiratory syncytial virus fusion inhibitor. *J. Antimicrob. Chemother.* 55: 289 – 292
- Claas, C., C. S. Stipp, and M. E. Hemler. 2001. Evaluation of prototype transmembrane 4 superfamily protein complexes and their relation to lipid rafts. *J. Biol. Chem.* 276: 7974 - 7984.
- Cook GA, Longhurst CM, Grgurevich S, Cholera S, Crossno JT, Jennings LK. Identification of CD9 extracellular domains in regulation of CHO cell adhesion to fibronectin and fibronectin pericellular matrix assembly. *Blood* 2002; 100: 4502 - 4511.
- Cormier, E. G., F. Tsamis, F. Kajumo, R. J. Durso, J. P. Gardner, and T. Dragic. 2004. CD81 is an entry coreceptor for hepatitis C virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 101: 7270 - 7274.
- Corver J, Ortiz A, Allison SL, Schalich J, Heinz FX, Wilschut J. Membrane fusion activity of tick-borne encephalitis virus and recombinant subviral particles in a liposomal model system. *Virology.* 2000 Mar 30; 269(1):37-46. PMID: 10725196.
- Covert Action, 6. August 1982, Institute for Media Analysis, NY, US.
- Crennell, S., Takimoto, T., Portner, A. and Taylor, G. (2000) Crystal structure of the multifunctional paramyxovirus hemagglutinin-neuraminidase. *Nat Struct Biol*, 7, 1068 - 1074.
- Curran, M. D., Clarke, D. K., and Rima, B. K. (1991). The nucleotide sequence of the gene encoding the attachment protein H of canine distemper virus. *J.Gen.Virol.* 72: 443 - 447.

D

- De Swart, Rik I., The pathogenesis of measles revisited; the pediatric infectious disease journal; vol 27; number 10, October 2008.
- Delaguillaumie, A., J. Harriague, S. Kohanna, G. Bismuth, E. Rubinstein, M. Seigneuret, and H. Conjeaud. 2004. Tetraspanin CD82 controls the association of cholesterol-dependent microdomains with the actin cytoskeleton in T lymphocytes: relevance to costimulation. *J. Cell Sci.* 117: 5269 - 5282.
- Deng H, Liu R, Ellmeier W, Choe S, Unutmaz D, Burkhart M, Di Marzio P, Marmon S, Sutton RE, Hill CM, Davis CB, Peiper SC, Schall TJ, Littman DR, Landau NR. Identification of a major co-receptor for primary isolates of HIV-1. *Nature.* 1996 Jun 20; 381 (6584): 647 - 8.
- Dörig, R. E., Marcil, A., Chopra, A. & Richardson, C. D. (1993). The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain). *Cell* 75, 295 - 305.
- Dragic, T., Litwin, V., Allaway, G. P., Martin, S. R., Huang, Y., et al., 1996. HIV-1 entry into CD4+ cells is mediated by the chemokine receptor CC-CKR-5. *Nature* 381:667 - 673.
- Duden, Herkunftswörterbuch.
- Dunster L.M., Schneider-Schaulies J, Löffler S, Lankes W, Schwartz-Albiez R, Lottspeich F, ter Meulen V. Moesin: a cell membrane protein linked with susceptibility to measles virus infection. *Virology.* 1994 Jan; 198 (1): 265 - 74. PMID: 8259662.
- Dunster, L. M., Schneider-Schaulies, J., Schnorr, J. - J., Schlender, J., Schneider-Schaulies, S., and ter Meulen, V. 1996. Receptor (CD46) Modulation and Complement - Mediated Lysis of Uninfected Cells after Contact with Measles Virus-Infected Cells. *J. Virol.* 70: 255 - 263.
- Dutch R. E., Leser GP, Lamb RA (1999). Paramyxovirus fusion protein: characterization of the core trimer, a rod-shaped complex with helices in anti-parallel orientation. *Virology*, 254: 147 - 59.
- Dutch, R. E., Jardetzky, T. S. and Lamb, R. A. (2000). Virus membrane fusion proteins: biological machines that undergo a metamorphosis. *Biosci Rep*, 20: 597 - 612.

E

- Earp, L. J., Delos, S. E., Park, H. E. and White, J. M. (2005). The many mechanisms of viral membrane fusion proteins. *Curr Top Microbiol Immunol*, 285: 25 - 66.
- Eaton, B. T., Wright, P. J., Wang, L. F., Sergeev, O., Michalski, W. P., Bossart, K. N. and Broder, C. C. (2004). Henipaviruses: recent observations on regulation of transcription and the nature of the cell receptor. *Arch Virol Suppl*: 122 - 131.
- Eckert, D. M., and P. S. Kim. (2001). Mechanisms of viral membrane fusion and its inhibition. *Annu. Rev. Biochem.* 70: 777 - 810.
- Egloff, M. P., Benarroch, D., Selisko, B., Romette, J. L., and Canard, B. (2002). *EMBO J.* 21: 2757 - 2768.
- El Mubarak HS, Yüksel S, Van Amerongen G, Mukhtar MM, De Swart RL, Osterhaus (2007) . Infection of cynomolgus macaques (*Macaca fascicularis*) and rhesus macaques (*Macaca mulatta*) with different wild-type measles viruses. *J. Gen. Virol* 88: 2028 - 2034.
- Elia G, Belloli C, Cirone F, Lucente MS, Caruso M, Martella V, Decaro N, Buonavoglia C, Ormas P. (2008). In vitro efficacy of ribavirin against canine distemper virus. *Antiviral Res.* 77: 108 - 13.
- Emi, N.; Friedmann, T.; Yee, J. K. (1991): Pseudotype formation of murine leukemia virus with the G protein of vesicular stomatitis virus. *Journal of Virology.*, 3: 1202 - 1207.
- Epand, R. M. (2003). Fusion peptides and the mechanism of viral fusion. *Biochim Biophys Acta*, 1614: 116 - 121.
- Erlenhöfer, C., Duprex, P., Rima B. K., ter Meulen V. and Schneider Schaulies J. (2002). Analysis of receptor (CD46, CD150) usage by measles virus. *J. of G. Virol.*, 83: 1431 - 1436.
- Erlenhoefer, C., Wurzer, WJ., Löffler, S., Schneider-Schaulies, S., ter Meulen, V. and Schneider-Schaulies, J. (2001). CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus, but not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition. *J Virol.*, 75: 4499 - 505.
- Escoffier, C.; Manie, S.; Vincent, S.; Muller, C. P.; Billeter, M.; Gerlier, D. (1999): Nonstructural C protein is required for efficient measles virus replication in human peripheral blood cells. *Journal of virology*, 2: 1695 - 1698.

Espenel C, Margeat E, Dosset P, Arduise C, Le Grimmellec C, Royer CA, Boucheix C, Rubinstein E, Milhiet PE (2008). Single-molecule analysis of CD9 dynamics and partitioning reveals multiple modes of interaction in the tetraspanin web. *J Cell Biol.* 18: 765 - 76.

Eurosurveillance Weekly, 2007; 12 (1) Jan. 25.

F

Falgout B and L Markoff (1995). Evidence that flavivirus NS1-NS2A cleavage is mediated by a membrane-bound host protease in the endoplasmic reticulum; *J Virol.*, 69: 7232 - 7243.

Fantini, J., Cook, D. G., Nathanson, N., Spitalnik, S. L., and Gonzalez-Scarano, F. (1993). Infection of colonic epithelial cell lines by type 1 human immunodeficiency virus is associated with cell surface expression of galactosylceramide, a potential alternative gp120 receptor. *PNAS*, 90:2700.

Felgner JH, Kumar R, Sridhar CN, Wheeler CJ, Tsai YJ, Border R, Ramsey P, Martin M, Felgner PL (1994). Enhanced gene delivery and mechanism studies with a novel series of cationic lipid formulations. *J Biol Chem.* 269: 2550 - 61.

Feng, Y., Broder, C. C., Kennedy, P. E., and Berger, E. A. (1996). HIV-1 entry cofactor: functional cDNA cloning of a seven transmembrane, G protein coupled receptor. *Science*, 272: 872 - 877.

Field, H., Young, P., Yob, J.M., Mills, J., Hall, L. and Mackenzie, J. (2001). The natural history of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect*, 3: 307 - 314.

Fischer L, Tronel JP, Minke J, Barzu S, Baudu P, Audonnet JC (2003). Vaccination of puppies with a lipid-formulated plasmid vaccine protects against a severe canine distemper virus challenge. *Vaccine*, 21: 1099 - 102.

Fischer L, Tronel JP, Pardo-David C, Tanner P, Colombet G, Minke J, Audonnet JC (2002) Vaccination of puppies born to immune dams with a canine adenovirus-based vaccine protects against a canine distemper virus challenge. *Vaccine*, 20: 3485 - 97.

Frank C, Schöneberg I, Krause G, Claus H, Ammon A, Stark K. Increase in imported dengue, Germany, 2001-2002 (2004). *Emerg Infect Dis.*, 10: 903 - 6.

Fu, J.; Tan, B. H.; Yap, E. H.; Chan, Y. C.; Tan, Y. H. (1992): Full-length cDNA sequence of dengue type 1 virus (Singapore strain S275/90). *Virology*, 188: 953 - 958.

Fujita K, Miura R, Yoneda M, Shimizu F, Sato H, Muto Y, Endo Y, Tsukiyama-Kohara K, Kai C. (2007). Host range and receptor utilization of canine distemper virus analyzed by recombinant viruses: Involvement of heparin-like molecule in CDV infection. *Virology*, 359: 324 - 35.

G

Gale NW, Baluk P, Pan L, Kwan M, Holash J, DeChiara TM, McDonald DM, Yancopoulos GD (2001). Ephrin-B2 selectively marks arterial vessels and neovascularization sites in the adult, with expression in both endothelial and smooth-muscle cells. *Dev Biol.*, 230: 151 - 160.

Gallay P, Hope T, Chin D, Trono D. (1997). HIV-1 infection of nondividing cells through the recognition of integrase by the importin/karyopherin pathway. *PNAS*, 94: 9825 - 30.

Gans HA, Arvin AM, Galinus J, Logan L, DeHovitz R, Maldonado Y. (1998). Deficiency of the humoral immune response to measles vaccine in infants immunized at age 6 months. *JAMA*, 280: 527 - 32.

Garenne, M., Leroy, O., Beau, J. P., and Sene, I. (1991). Child mortality after high-titre measles vaccines: prospective study in Senegal. *Lancet*, 338: 903 - 907.

Gehrke R, Ecker M, Aberle SW, Allison SL, Heinz FX, Mandl CW (2003). Incorporation of tick-borne encephalitis virus replicons into virus-like particles by a packaging cell line. *J Virol.* 77: 8924 - 33.

Gemma, T., Watari, T., Akiyama, K., Miyashita, N., Shin, Y.-S., Iwatsuki, K., Kai, C. & Mikami, T. (1996). Epidemiological observations on recent outbreaks of canine distemper in Tokyo area. *J. of Vet. Medical Science*, 58: 547 - 550.

Gibbons DL, Reilly B, Ahn A, Vaney MC, Vigouroux A, Rey FA, Kielian M. (2004). Purification and crystallization reveal two types of interactions of the fusion protein homotrimer of Semliki Forest virus. *J Virol.* 7: 3514 - 23.

Glazier, K., Raghov, R. and Kingsbury, D.W. (1977) Regulation of Sendai virus transcription: evidence for a single promoter in vivo. *J Virol*, 21, 863 - 871.

Goldsmith, C.S., Whistler, T., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., Rota, P. A., Bellini, W.J., Daszak, P., Wong, K. T., Shieh, W. J. and Zaki, S. R. (2003) Elucidation of Nipah virus morphogenesis and replication using ultrastructural and molecular approaches. *Virus Res*, 92: 89 - 98.

- Gordon-Alonso M, Yanez-Mo M, Barreiro O, Alvarez S, Munoz-Fernandez MA, Valenzuela-Fernandez A, Sanchez-Madrid F. (2006). Tetraspanins CD9 and CD81 modulate HIV-1-induced membrane fusion. *J Immunol*, 177: 5129 - 5137.
- Gottschalk, U., Vesting, J.-W. (1998). Naturwissenschaftliche und juristische Aspekte der Gentherapie.
- Graham FL, van der Eb AJ. (1973). A new technique for the assay of infectivity of human adenovirus 5 DNA. *Virology*. 52:456-67.
- Greber UF, Way M. (2006). A superhighway to virus infection. *Cell*, 124: 741 - 754.
- Greenberg, M., N. Cammack, M. Salgo, and L. Smiley. (2004). HIV fusion and its inhibition in antiretroviral therapy. *Rev. Med. Virol.*, 14: 321 - 337.
- Greta L. Reutter, Case Cortese-Grogan, Julie Wilson and Sue A. Moyer (2001). Mutations in the Measles Virus C Protein That Up Regulate Viral RNA Synthesis. *Virology*, 285: 100 - 109.
- Griffin DE, Pan CH, Moss WJ (2008). Measles vaccines. *Front Biosci*, 13: 1352 - 1370.
- Griffin DE: Measles Virus (2007); *Fields Virology*; 5th edition Philadelphia; 1551 - 1585.
- Griffin, D. E, D. M. Knipe, P. M. Howley, R. A. Lamb, M. A. Martin, B. Roizman, and S.E. Straus ed., (2001). Measles Virus, *Fields virology*, 4th ed., 1401 - 1441.
- Guangwei Min, Huaibin Wang, Tung-Tien Sun, and Xiang-Peng Kong (2006). Structural basis for tetraspanin functions as revealed by the cryo-EM structure of uroplakin complexes at 6-Å resolution. *JCB*, 173: 975 - 983.
- Gubler, D. J.; Reed, D.; Rosen, L.; Hitchcock, J. r.R.J. (1978): Epidemiologic, clinical, and virologic observations on dengue in the Kingdom of Tonga. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 27: 581 - 589.
- Gutierrez-Lopez MD, Ovalle S, Yanez-Mo M, Sanchez-Sanchez N, Rubinstein E, Olmo N, Lizarbe MA, Sanchez-Madrid F, Cabanas C (2003). A functionally relevant conformational epitope on the CD9 tetraspanin depends on the association with activated beta1 integrin. *J Biol Chem.*, 278: 208 - 18.
- Guzman, M. G.; Kouri, G. (1996): Advances in dengue diagnosis. *Clinical and diagnostic laboratory immunology*, 3: 621 - 627.

H

- Hahn, Y. S.; Galler, R.; Hunkapiller, T.; Dalrymple, J. M.; Strauss, J. H.; Strauss, E. G. (1988). Nucleotide sequence of dengue 2 RNA and comparison of the encoded proteins with those of other flaviviruses. *Virology*, 162: 167 - 180.
- Halpin, K., Bankamp, B., Harcourt, B.H., Bellini, W.J. and Rota, P.A. (2004). Nipah virus conforms to the rule of six in a minigenome replication assay. *J Gen Virol*, 85: 701 - 707.
- Hammar, L., Haag, L., Wu, B., and Cheng, R. H. (2004). Approaching the Structure of Large Molecular Assemblies and Their Mechanism of Action. , *Conformational Proteomics of Macromolecular Architecture*, 78 - 108.
- Harcourt, B. H., Tamin, A., Halpin, K., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Bellini, W. J. and Rota, P. A. (2001). Molecular characterization of the polymerase gene and genomic termini of Nipah virus. *Virology*, 287: 192 - 201.
- Harcourt, B. H., Tamin, A., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Anderson, L. J., Bellini, W. J. and Rota, P. A. (2000). Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology*, 271: 334 - 349.
- Harder, T. C and Osterhaus, A. D. M. E. (1997). Canine distemper virus - a morbillivirus in search of new hosts? *Trends in Microbiol.*, 5: 120 - 124.
- Harder, T. C., Kenter, M., Appel, M. J. G., Roelke-Parker, M. E., Barrett, T. & Osterhaus, A. D. M. E. (1995). Phylogenetic evidence of canine distemper virus in Serengeti's lions. *Vaccine*, 13: 521 - 523.
- Hardy H, Skolnik PR (2004). Enfuvirtide, a new fusion inhibitor for therapy of human immunodeficiency virus infection. *Pharmacotherapy*, 24: 198 - 211.
- Harouse, J. M., Bhat, S., Spitalnik, S. L., Laughlin, M., Stefano, K., Siberberg, D. H., and Gonzalez-Scarano, F. (1991). Inhibition of HIV-1 in Neural Cell Lines by Antibodies Against Galactosyl Ceramide. *Science*, 253: 320 - 323.
- Harrison SC (2008). Viral membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol.* , 15: 690 - 8.
- Hato, T., Sumida, M. Yasukawa, M. Watanabe, A., Okuda, H. and Kobayashi, Y. (1990). Induction of platelet Ca²⁺ influx and mobilisation by a monoclonal antibody to CD9 antigen. *Blood*, 75: 1087 - 1091.
- He, Y., R. Vassell, M. Zaitseva, N. Nguyen, Z. Yang, Y. Weng, and C. D. Weiss (2003). Peptides trap the human immunodeficiency virus type 1 envelope glycoprotein fusion intermediate at two sites. *J. Virol.*, 77: 1666 - 1671.
- Hemler, M. E. (2003). Tetraspanin proteins mediate cellular penetration, invasion, and fusion events and define a novel type of membrane microdomain. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.*, 19: 397 - 422.

- Henchal, E. A.; Putnak, J. R. (1990). The dengue viruses. *Clinical microbiology reviews*. 3: 376 - 396.
- Hernandez, L. D., Hoffman, L.R., Wolfsberg, T. G. and White, J. M. (1996). Virus-cell and cell-cell fusion. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 12: 627 - 661.
- Herrler, G., Rott, R., Klenk, H. - D., Müller, H. - P., Shukla, A. K. and Schauer, R. (1985). The receptor-destroying enzyme of influenza C virus is a neuraminidase-O-acetyltransferase. *EMBO J.*, 4: 1503.
- Hidari KI, Takahashi N, Arihara M, Nagaoka M, Morita K, Suzuki T (2008). Structure and anti-dengue virus activity of sulfated polysaccharide from a marine alga. *Biochem Biophys Res Commun.*, 376: 91 - 5.
- Hillemann MR (2001): Current overview of the pathogenesis and prophylaxis of measles with focus on practical implications. *Vaccine* 2001; 20: 651 - 665.
- Ho, L. J.; Wang, J. J.; Shaio, M. F.; Kao, C. L.; Chang, D. M.; Han, S. W.; Lai, J. H. (2001). Infection of human dendritic cells by dengue virus causes cell maturation and cytokine production. *Journal of immunology*, 166: 1499 - 1506.
- Homma, M. (1971). Trypsin activation on the growth of Sendai virus in tissue culture cells. I. Restoration of the infectivity for L cells by direct action of trypsin on L cell borne Sendai virus. *J virol*, 8: 619 - 629.
- Hooper, P., Zaki, S., Daniels, P. and Middleton, D. (2001). Comparative pathology of the diseases caused by Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect*, 3, 315 - 322.
- Horikami, S. M.; Moyer, S. A. (1995). Structure, transcription, and replication of measles virus. *Current topics in microbiology and immunology.*, 191: 35 - 50.
- Horvath, C.M. (2004). Silencing STATs: lessons from paramyxovirus interferon evasion. *Cytokine Growth Factor Rev*, 15: 117 - 127.
- Hosoya N, Miura T, Kawana-Tachikawa A, Koibuchi T, Shioda T, Odawara T, Nakamura T, Kitamura Y, Kano M, Kato A, Hasegawa M, Nagai Y, Iwamoto A (2008). Comparison between Sendai virus and adenovirus vectors to transduce HIV-1 genes into human dendritic cells: *J Med Virol.*, 80: 373 - 82.
- Hrobowski Yancey, M Robert F Garry and Scott F Michael (2005), Peptide inhibitors of dengue virus and West Nile virus infectivity *Virology* 2005; 2: 49.
- Hsu, V. P., Hossain, M.J., Parashar, U.D., Ali, M.M., Ksiazek, T.G., Kuzmin, I., Niezgodna, M., Rupprecht, C., Bresee, J. and Breiman, R.F. (2004). Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh. *Emerg Infect Dis*, 10: 2082 - 2087.
- Huang, Y. H.; Lei, H. Y.; Liu, H. S.; Lin, Y. S.; Liu, C. C.; Yeh, T. M. (2000): Dengue virus infects human endothelial cells and induces IL-6 and IL-8 production. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 63, 71 - 75.
- Hyatt, A.D., Zaki, S.R., Goldsmith, C.S., Wise, T.G. and Hengstberger, S.G. (2001). Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect*, 3: 297 - 306.
- I**
- Iehlé, C., Razafitrimo, G., Razainirina, J., Andriaholinirina, N, Goodman, SM, Faure, C, Georges-Courbot, M, Rousset, D, Reynes, JM. (2007). Henipavirus and Tioman Virus Antibodies in Pteropodid Bats, Madagascar. *Emerg Infect Dis.*, 13: 159 - 61.
- Ikeyama S, Koyama M, Yamaoko M, Sasada R, Miyake M (1993). Suppression of cell motility and metastasis by transfection with human motility-related protein (MRP-1/CD9) DNA. *Journal of Experimental Medicine* 177: 1231 - 1237.
- Increase in Imported Dengue, Germany, 2001 - 2002.
- Iorio RM, Mahon PJ (2008). Paramyxoviruses: different receptors - different mechanisms of fusion. *Trends Microbiol*, 16: 135-7.
- Israels SJ, McMillan-Ward EM (2007). Platelet tetraspanin complexes and their association with lipid rafts; *Thromb Haemost*, 98: 1081 - 7.
- Iwatsuki K, Tokiyoshi S, Hirayama N, Nakamura K, Ohashi K, Wakasa C, Mikami T, Kai C (2000). Antigenic differences in the H proteins of canine distemper viruses. *Vet Microbiol.*, 71: 281 - 6.
- J**
- Jaffe and Hall (2005). *Biochemistry and Biology: Annual Review of Cell and Developmental Biology*.
- Jacinto A, Martinez-Arias A, Martin P (2001). Mechanisms of epithelial fusion and repair. *Nat Cell Biol*; 3: E117 - 123.
- Jauniaux T. (1998). *New Scientist*, Seite 23.

Johansson Kenth, Jean-Marie Bourhis Valerie Campanacci, Christian Cambillau, Bruno Canard, and Sonia Longhi (2003) Crystal Structure of the Measles Virus Phosphoprotein Domain Responsible for the Induced Folding of the C-terminal Domain of the Nucleoprotein. *Biol Chem.*; 278: 44567 - 73

Johnson RT (1998) *Viral infections of the nervous system*. Lippincott-Raven.

Jolly C, Sattentau QJ (2007). Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains. *J Virol.* 81: 7873 - 84.

K

Kaji K, Oda S, Shikano T, Ohnuki T, Uematsu Y, Sakagami J, Tada N, Miyazaki S, Kudo A (2000). The gamete fusion process is defective in eggs of CD9-deficient mice. *Nat Genet*; 24: 279 - 282.

Kapil Sanjay, Robin W. Allison, Larry Johnston III, Brandy L. Murray, Steven Holland, Jim Meinkoth, and Bill Johnson. Canine Distemper Virus Strains Circulating among North American Dogs. *Clin Vaccine Immunol.*, 15: 707 - 12.

Karavanas, G.; Marin, M.; Salmons, B.; Gunzburg, W. H.; Piechaczyk, M. (1998): Cell targeting by murine retroviral vectors. *Critical reviews in oncology/hematology*, 1: 7 - 30.

Karlin, D., Longhi, S., Receveur, V., and Canard, B. (2002). Substitution of two residues in the measles virus nucleoprotein results in an impaired self-association. *J. Virology*, 296: 251 - 262.

Kawai N, Aumüller G (1998). Immuno-electron microscopical localisation of alpha-actinin and actin in microvilli of prostatic epithelial cells. *J Anat.*; 161: 125 - 32.

Kawai S, Nishizawa M. (1984). New procedure for DNA transfection with polycation and dimethyl sulfoxide. *Mol Cell Biol.*; 4: 1172 - 4.

Kay Brian, Vu Sinh Nam (2005). New strategy against *Aedes aegypti* in Vietnam. *The Lancet*, 365: 613 - 617.

Kempe, Fulginiti (1965). The pathogenesis of measles virus infection. *Arch Gesamte Virusforsch.*; 16: 103 - 28.

Kielian, M. (2006). Class II virus membrane fusion proteins. *J. Virology*, 5; 344: 38 - 47.

Kilby, J. M., S. Hopkins, T. M. Venetta, B. DiMassimo, G. A. Cloud, J. Y. Lee, L. Alldredge, E. Hunter, D. Lambert, D. Bolognesi, T. Matthews, M. R. Johnson, M. A. Nowak, G. M. Shaw, and M. S. Saag. (1998). Potent suppression of HIV-1 replication in humans by T-20, a peptide inhibitor of gp41-mediated virus entry. *Nat. Med.*, 4:1302-1307.

King, C. A.; Marshall, J. S.; Alshurafa, H.; Anderson, R. (2000). Release of vasoactive cytokines by antibody-enhanced dengue virus infection of a human mast cell/basophil line. *J. Virology.*, 15: 7146 - 7150.

Klenk, H.D. and Garten, W. (1994). Host cell proteases controlling virus pathogenicity. *Trends Microbiol.*, 2: 39 - 43.

Kotha J, Longhurst C, Appling W, Jennings LK. (2008). Tetraspanin CD9 regulates beta 1 integrin activation and enhances cell motility to fibronectin via a PI-3 kinase-dependent pathway. *Exp Cell Res.*; 314: 1811-22.

Kovalenko OV, Metcalf DG, DeGrado WF, Hemler ME (2005). Structural organization and interactions of transmembrane domains in tetraspanin proteins. *BMC Struct Biol.*, 5: 11.

Kovalenko OV, Yang X, Kolesnikova TV, Hemler ME (2004). Evidence for specific Tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking. *J. Biochem*; 377: 407 - 417.

Kovamees, J., Blixenkrone-Moller, M., and Norrby, E. (1991). The nucleotide and amino acid sequence of the attachment protein of canine distemper virus. *Virus Res.*, 19: 223 - 233.

Krakowka, S., R. J. Higgins, and A. Koestner (1980). Canine distemper virus: Review of structural and functional modulations in lymphoid tissues. *Am. J. Vet. Res.*, 41: 284 - 292.

Kuhn RJ, Zhang W, Rossmann MG, Pletnev SV, Corver J, Lenches E, Jones CT, Mukhopadhyay S, Chipman PR, Strauss EG, Baker TS, Strauss JH (2002). Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. *Cell*; 108: 717 - 25.

L

Labor Spiez, Fact Sheet, Dengue-Fever, (2005). internet www.labor-spiez.ch;

Lagaudriere-Gesbert, C., F. Le Naour, S. Lebel-Binay, M. Billard, E. Lemichez, P. Boquet, C. Boucheix, H. Conjeaud, and E. Rubinstein (1997). Functional analysis of four tetraspans, CD9, CD53, CD81, and CD82, suggests a common role in costimulation, cell adhesion, and migration: only CD9 upregulates HB-EGF activity. *Cell. Immunol.*, 182: 105 - 112.

Lamb, R. A., R. G. Paterson, and T. S. Jardetzky. (2006). Paramyxovirus membrane fusion: lessons from the F and HN atomic structures. *J. Virology*, 344: 30-37.

- Lamb, R.A. (1993). Paramyxovirus fusion: a hypothesis for changes. *J. Virology*, 197: 1 - 11.
- Lamb, R.A., and Kolakofsky, D. (2001). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. In *Fields Virology*. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, 4th ed, 1305 - 1340.
- Lambert DM, Barney S, Lambert AL, Guthrie K, Medinas R, Davis DE, Bucy T, Erickson J, Merutka G, Petteway SR Jr (1996). Peptides from conserved regions of paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *PNAS*, 93: 2186-91.
- Lan NT, Yamaguchi R, Kai K, Uchida K, Kato A, Tateyama S (2005). The growth profiles of three types of canine distemper virus on Vero cells expressing canine signaling lymphocyte activation molecule. *J Vet Med Sci* 67:491 - 495.
- Langedijk, J. P. M., Daus, F. J., and van Oirschot, J. T., (1997). Sequence and Structure Alignment of Paramyxoviridae Attachment Proteins and Discovery of Enzymatic Activity for a Morbillivirus Hemagglutinin. *J. Virol.*, 71:6155 - 6167.
- Laura E. Luque and Charles J. Russell (2007). Spring-Loaded Heptad repeat Residues Regulate the Expression and Activation of Paramyxovirus Fusion Protein *J. Virol.*, 81: 3130 - 3141.
- Le Naour, F., E. Rubinstein, C. Jasmin, M. Prenant, and C. Boucheix. (2000). Severely reduced female fertility in CD9-deficient mice. *Science*, 287: 319 - 321.
- Lee KE, Umapathi T, Tan CB, Tjia HT, Chua TS, Oh HM, Fock KM, Kurup A, Das A, Tan AK, Lee WL (1999). The neurological manifestations of Nipah virus encephalitis, a novel paramyxovirus. *Annals of Neurology*; 46:428 - 32.
- Leonard Vincent H.J., Patrick L. Sinn, Gregory Hodge, Tanner Miest, Patricia Devaux, Numan Oezguen, Werner Braun, Paul B. McCray Jr., Michael B. McChesney, and Roberto Cattaneo (2008). Measles virus blind to its epithelial cell receptor remains virulent in rhesus monkeys but cannot cross the airway epithelium and is not shed. *J Clin Invest.*, 118: 2448 - 58.
- Leppert, M., Rittenhouse, L., Perrault, J., Summers, D.F. and Kolakofsky, D. (1979). Plus and minus strand leader RNAs in negative strand virus-infected cells. *Cell*, 18, 735 - 747.
- Lescar, J; Roussel, A; Wien, MW; Navaza, J; Fuller, SD; Wengler, G; Rey, FA. The Fusion glycoprotein shell of Semliki Forest virus: an icosahedral assembly primed for fusogenic activation at endosomal pH. (2001). *Cell*; 105: 137 - 148.
- Leung, D.; Schroder, K.; White, H.; Fang, N. X.; Stoermer, M. J.; Abbenante, G. et al. (2001): Activity of recombinant dengue 2 virus NS3 protease in the presence of a truncated NS2B co-factor, small peptide substrates, and inhibitors. *The Journal of biological chemistry*, 49: 45762 - 45771.
- Levy, S., and T. Shoham (2005). The tetraspanin web modulates immunosignalling complexes. *Nat. Rev. Immunol.* 5: 136 - 148.
- Levy, S., S. C. Todd, and H. T. Maecker. (1998). CD81 TAPA-1: a molecule involved in signal transduction and cell adhesion in the immune system. *Annu. Rev. Immunol.*, 16: 89 - 109.
- Li L, Lok SM, Yu IM, Zhang Y, Kuhn RJ, Chen J, Rossmann MG (2008). The flavivirus precursor membrane-envelope protein complex: structure and maturation. *Science*; 319: 1830 - 4.
- Libraty, D. H.; Young, P. R.; Pickering, D.; Endy, T. P.; Kalayanarooj, S.; Green, S. (2002). High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. *The Journal of infectious diseases*, 8: 1165 - 1168.
- Lim CC, Sitoh YY, Lee KE, Kurup A, Hui F (1999): Meningoencephalitis caused by a novel paramyxovirus: an advanced MRI case report in an emerging disease. *Singapore Medical Journal*; 40: 356 - 358.
- Liston, P.; Briedis, D. J. (1995). Ribosomal frameshifting during translation of measles virus P protein mRNA is capable of directing synthesis of a unique protein. *J. Virology.*, 11: 6742 - 6750.
- Liston, P.; DiFlumeri, C.; Briedis, D. J. (1995). Protein interactions entered into by the measles virus P, V, and C proteins. *Virus research*. 2-3: 241 - 259.
- Littaua, R.; Kurane, I.; Ennis, F. A. (1990). Human IgG Fc receptor II mediates antibody-dependent enhancement of dengue virus infection. *Journal of immunology*, 8: 3183 - 3186.
- Löffler, S., F. Lottspeich, F. Lanza, D. O. Azorsa, V. ter Meulen, and J. Schneider-Schaulies, (1997). CD9, a tetraspan transmembrane protein, renders cells susceptible to canine distemper virus. *J. Virol.*, 71: 42 - 49.
- Longhurst CM, Jacobs JD, White MM, Crossno JT Jr, Fitzgerald DA, Bao J, Fitzgerald TJ, Raghov R, Jennings LK (2002). Chinese hamster ovary cell motility to fibronectin is modulated by the second extracellular loop of CD9. Identification of a putative fibronectin binding site. *J Biol Chem.*, 277: 32445 - 52.
- Lorenz D, Albrecht P (1980). Susceptibility of tamarins (*Saguinus*) to measles virus. *Lab Anim Sci.*; 30: 661 - 5.
- Lozahic S, Dale Christiansen, Serge Manié, Denis Gerlier, Martine Billard, Claude Boucheix and Rubinstein Eric (2000). CD46 (membrane cofactor protein) associates with multiple 1 integrins and tetraspans. *European Journal of Immunology*, 30: 900 - 907.

Lu, J., Sista P., Giguel F., Greenberg M. and Kuritzkes D. R. (2004). Relative replicative fitness of human immunodeficiency virus type 1 mutants resistant to enfuvirtide (T - 20). *J. Virol.*, 78: 4628 - 4637.

Luque LE, Russell CJ (2007). Spring-loaded Heptad repeat residues regulate the expression and activation of paramyxovirus fusion protein. *J Virol.*; 81: 3130 - 41.

Lusso, P., Secchiero, P., Crowley, R. W., Garzino-Demo, A., Berneman, Z. N., and Gallo, R. C. (1994). CD4 is a critical component of the receptor for human herpesvirus 7: Interference with human immunodeficiency virus. *PNAS*, 91: 3872.

M

Mackow, E.; Makino, Y.; Zhao, B. T.; Zhang, Y. M.; Markoff, L.; Buckler-White, A. et al. (1987): The nucleotide sequence of dengue type 4 virus: analysis of genes coding for nonstructural proteins. *Virology*, 2, 217 - 228.

Maes RK, Wise AG, Fitzgerald SD, Ramudo A, Kline J, Vilnis A, Benson C. (2003). A canine distemper outbreak in Alaska: diagnosis and strain characterization using sequence analysis. *J Vet Diagn Invest.*; 15: 213 - 20.

Malavige, G. N.; Fernando, S.; Fernando, D. J.; Seneviratne, S. L. (2004): Dengue viral infections. *Postgrad Med J*, 948: 588 - 601.

Malvoisin, E., and T. F. Wild. (1993). Measles virus glycoproteins: studies on the structure and interaction of the hemagglutinin and fusion proteins. *J. Gen. Virol.*, 74: 2365 - 2372.

Mamaev LV, Denikina NN, Belikov SI, Volchkov VE, Visser IK, Fleming M, Kai C, Harder TC, Liess B, Osterhaus AD (1995). Characterisation of morbilliviruses isolated from Lake Baikal seals (*Phoca sibirica*). *Vet Microbiol.*, 44: 251 - 9.

Mamaev, L.V., I.K. Visser, S.I. Belikov, N.N. Denikina, T. Harder, L. Goatley, B. Rima, B. Edgington, A.D.M.E. Osterhaus, and T. Barrett (1996). Canine distemper virus in lake Baikal seals (*phoca sibirica*). *The Veterinary Record*, 138: 437 - 439.

Mandl, C. W.; Guirakhoo, F.; Holzmann, H.; Heinz, F. X.; Kunz, C. (1989). Antigenic structure of the flavivirus envelope protein E at the molecular level, using tick-borne encephalitis virus as a model. *Journal of Virology*, 2: 564 - 571.

Marianneau P, Megret F, Olivier R, Morens DM, Deubel V (1996). Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *J Gen Virol.*, 77: 2547 - 2554.

Markwell MA, Svennerholm L, Paulson JC (1981). Specific gangliosides function as host cell receptors for Sendai virus. *PNAS*; 78: 5406 - 10.

Marsh, M. and Helenius, A. (1989). Virus entry into animal cells. *Adv Virus Res*, 36, 107 - 151.

Martinez, E.; Guzman, M. G.; Valdes, M.; Soler, M.; Kouri, G. (1993). Dengue fever and hemorrhagic dengue in infants with a primary infection. *Revista cubana de medicina tropical*, 2: 97 - 101.

Matusan, A. E.; Pryor, M. J.; Davidson, A. D.; Wright, P. J. (2001). Mutagenesis of the Dengue virus type 2 NS3 protein within and outside helicase motifs: effects on enzyme activity and virus replication. *J. Virology*, 20: 9633 - 9643.

McInerney GM, Smit JM, Liljeström P, Wilschut J.(2004). Semliki Forest virus produced in the absence of the 6K protein has an altered spike structure as revealed by decreased membrane fusion capacity. *J. Virology.*, 325: 200 - 6.

Medizincontrolling des Universitätsklinikums Münster - DRG-Research Group.

Melikyan, G. B., Markosyan R. M., Hemmati H., Delmedico M.K., Lambert D.M. and Cohen F.S. (2000). Evidence that the transition of HIV-1 gp41 into a six-helix bundle, not the bundle configuration, induces membrane fusion. *J. Cell Biol.* 151: 413 - 423.

Mercado-Curiel Ricardo F, William C Black IV and Maria de L Muñoz (2008); A dengue receptor as possible genetic marker of vector competence in *Aedes aegypti*. *BMC Microbiology*, 8: 118.

Messer, W. B.; Gubler, D. J.; Harris, E.; Sivananthan, K.; de, Silva A M. (2003): Emergence and global spread of a dengue serotype 3, subtype III virus. *Emerging infectious diseases*, 7: 800 - 809.

Miele JA, Krakowka S (1983). Antibody responses to virion polypeptides in gnotobiotic dogs infected with canine distemper virus. *Infect Immun.*; 41: 869 - 71.

Miller AD, Miller DG, Garcia JV, Lynch CM (1993). Use of retroviral vectors for gene transfer and expression. *Methods Enzymol.* 217: 581 - 99.

Miller AD (1996). Cell-surface receptors for retroviruses and implications for gene transfer. *PNAS*, 93: 11407 - 13.

Miller, Brent J., Georges-Labouesse, Elisabeth, Primakoff Paul, and Myles, Diana G. (2000). Normal Fertilization Occurs with Eggs Lacking the Integrin $\alpha 6 \beta 1$ and is CD9-dependent. *J Cell Biol.*, 149: 1289 - 96.

Miyado K, Yamada G, Yamada S, Hasuwa H, Nakamura Y, Ryu F, Suzuki K, Kosai K, Inoue K, Ogura A, Okabe M, Mekada E. (2000). Requirement of CD9 on the egg plasma membrane for fertilization. *Science*; 287: 321 - 324.

- Miyado K, Yoshida K, Yamagata K, Sakakibara K, Okabe M, Wang X, Miyamoto K, Akutsu H, Kondo T, Takahashi Y, Ban T, Ito C, Toshimori K, Nakamura A, Ito M, Miyado M, Mekada E, Umezawa (2008); The fusing ability of sperm is bestowed by CD9-containing vesicles released from eggs in mice. *PNAS*, 105: 12921 – 6.
- Miyake M et al (1995). Motility related protein 1 (MRP1/CD9) expression: inverse correlation with metastases in breast cancer. *Cancer Research*, 55: 4127-4131.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC. Structure of the dengue virus envelope protein after membrane fusion. *Nature*. 2004 Jan 22; 427: 313 - 9.
- Modis Y, Ogata S, Clements D, Harrison SC (2003). A ligand-binding pocket in the dengue virus envelope glycoprotein. *PNAS*, 100: 6986 - 91.
- Modrow, S., Falke, D, Tryen, U. (2003). Paramyxoviren in *Molekulare Virologie*. Spektrum Akademischer Verlag, Heidelberg, Berlin, 265-300.
- Mohd Nor, M.N., Gan, C.H. and Ong, B. L. (2000). Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Rev Sci Tech*, 19, 160 - 165.
- Moll M, Diederich S, Klenk HD, Czub M, Maisner A. Ubiquitous activation of the Nipah virus fusion protein does not require a basic amino acid at the cleavage site. *J. Virol.*, 78: 9705 - 12.
- Moll, M.; Klenk, H. D.; Herrler, G.; Maisner, A. (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. *The Journal of biological chemistry*, 276: 17887 - 17894.
- Morell, V. (1994). Serengeti's big cats going to the dogs; *Science*, 264: 1664.
- Morrison, T. and Portner, A. (1991). Structure, function and intracellular processing of the glycoproteins of paramyxoviridae.
- Morrison, TG (2003). Structure and function of a paramyxovirus fusion protein. *Biochim Biophys Acta*; 1614: 73 - 84
- Moyer SA, Baker SC, Horikami SM (1990). Host cell proteins required for measles virus reproduction. *J Gen Virol.*, 71: 775 – 783.
- Mukhopadhyay S, Kuhn RJ, Rossmann MG (2005). A structural perspective of the flavivirus life cycle. *Nat Rev Microbiol*; 3: 13 - 22.
- Mungall, B.A., Middleton, D., Cramer, G., Bingham, J., Halpin, K., Russell, G., Green, D., McEachern, J., Pritchard, L.I., Eaton, B.T., Wang, L.F., Bossart, K.N. and Broder, C.C. (2006). Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *J Virol*, 80: 12293 - 12302.
- Munson L, Terio KA, Kock R, Mlengya T, Roelke ME, Dubovi E, Summers B, Sinclair AR, Packer C (2008). Climate extremes promote fatal co-infections during canine distemper epidemics in African lions.; *PLoS ONE*; 3: 2545.
- Murphy, F., Fauquet, CM, Bishop, DHL, Ghabriel, SA, Jarvis, AW, Martelli, GP, Mayo, MA, Summers, MD. (1995). *Virus taxonomy, Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses*. Springer-Verlag, Wien.
- Murphy, F. A., E.P.J. Gibbs, M.C. Horzinek, and M.J. Studdert (1999). *Vet. Virol.*, 3rd: 411 – 428.

N

- Naldini L, Blömer U, Gage FH, Trono D, Verma IM (1996). Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. *PNAS*; 93:11382 - 8.
- Naniche, D., Varior-Krishnan, G., Cervoni, F., Wild, T.F., Rossi, B., Roubardin-Combe, C., and Gerlier, D. (1993a). Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus. *J. Virol.*, 67: 6025 - 6032.
- Naniche, D., Wild, T. F., Roubardin-Combe, C., and Gerlier, D. (1993b). Measles virus haemagglutinin induces down-regulation of gp57/67, a molecule involved in virus binding. *J. Gen. Virol.*, 74: 1073 - 1079.
- Narayanan, M.; Aravind, M. A.; Thilothammal, N.; Prema, R.; Sargunam, C. S.; Ramamurthy, N. (2002). Dengue fever epidemic in Chennai--a study of clinical profile and outcome. *Indian pediatrics*, 11: 1027 - 1033.
- Negrete Oscar A, Mike C Wolf, Hector C Aguilar, Sven Enterlein, Wei Wang, Elke Mühlberger, Stephen V Su, Andrea Bertolotti-Ciarlet, Ramon Flick, 2 and Benhur Lee (2006). Two Key Residues in EphrinB3 Are Critical for Its Use as an Alternative Receptor for Nipah Virus; *PLoS Pathog.*, 2: 7.
- Negrete Oscar A., Ernest L. Levrony, Hector C. Aguilar, Andrea Bertolotti-Ciarlet, Ronen Nazarian, Sara Tajyar & Benhur Lee (2005). EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus: *Nature* 436: 401 - 405 (21 July 2005).
- Neumann E, Schaefer-Ridder M, Wang Y, Hofschneider PH. (1982). Gene transfer into mouse lymphoma cells by electroporation in high electric fields. *J. EMBO*; 1: 841 - 5.

Niewiesk S (1999). Cotton rats (*Sigmodon hispidus*): an animal model to study the pathogenesis of measles virus infection. *Immunol Lett*, 65: 47 - 50.

Niedermeier Sabine, Singethan Katrin, Rohrer Sebastian G., Matz Magnus, Kossner Markus, Diederich Sandra, Maisner Andrea, Schmitz Jens, Baumann Knut, Holzgrabe Ulrike and Schneider-Schaulies Jürgen (2008). A small molecule inhibitor of Nipah virus envelope protein-mediated membrane fusion; *J. of Medicinal Chemistry*; submitted for publication.

Nishie Tomomi; Nagata Kyosuke; Takeuchi Kaoru (2007). The C protein of wild-type measles virus has the ability to shuttle between the nucleus and the cytoplasm. *Microbes Infect.*, 9: 344 - 354.

Norrby E (1974). Subacute sclerosing panencephalitis (SSPE) agent in hamsters. III. Induction of defective measles infection in hamster brain. *Exp Mol Pathol.*, 21: 166 - 178

Norrby, E., and M. N. Oxman (1990). Measles virus. B. N. Fields and D. N. Knipe (ed.), *Virology*, 1013 - 1044.

Noticias - Más de 3,000 afectados por dengue; FFAA a hospitales.

Nozawa Y, Ono N, Abe M, Sakuma H, Wakasa H (1994). An immunohistochemical study of Warthin-Finkeldey cells in measles. *Pathol. Int.*, 44: 442 - 7.

O

Okada, H.; Sato, T. A.; Katayama, A.; Higuchi, K.; Shichijo, K.; Tsuchiya, T. et al. (2001). Comparative analysis of host responses related to immunosuppression between measles patients and vaccine recipients with live attenuated measles vaccines. *Archives of virology*, 5: 859 - 874.

Okazaki, K; Kida, H. (2004). A synthetic peptide from a Heptad repeat region of herpesvirus glycoprotein B inhibits virus replication. *J Gen Virol.*; 85: 2131 - 2137.

Osatomi, K.; Sumiyoshi, H. (1990). Complete nucleotide sequence of dengue type 3 virus genome RNA. *Virology*; 2, 643 - 647.

Ozaki, Y., K. Satoh, K. Kuroda, R. Qi, Y. Yatomi, S. Yanagi, K. Sada, H. Yamamura, M. Yanabu, S. Nomura, and S. Kume (1995). Anti-CD9 monoclonal antibody activates p72syk in human platelets. *J. Biol. Chem.*, 270: 15119 - 15124.

P

Pardo ID, Johnson GC, Kleiboeker SB (2005). Phylogenetic characterization of canine distemper viruses detected in naturally infected dogs in North America. *J Clin Microbiol.*, 43: 5009 – 17.

Pardo MC, Tanner P, Bauman J, Silver K, Fischer L (2007). Immunization of puppies in the presence of maternally derived antibodies against canine distemper virus. *J Comp Pathol.*; 137: 72 - 5.

Park, M.S., Shaw, M.L., Munoz-Jordan, J., Cros, J.F., Nakaya, T., Bouvier, N., Palese, P., Garcia-Sastre, A. and Basler, C. F. (2003). Newcastle disease virus (NDV) - based assay demonstrates interferon-antagonist activity for the NDV V protein and the Nipah virus V, W, and C proteins. *J Virol*, 77: 1501 - 1511.

Paterson, R. G. and R. A. Lamb. (1993). The molecular biology of influenza viruses and paramyxoviruses. *Molecular virology*, 35 - 73.

Paton, N.I., Leo, Y.S., Zaki, S.R., Auchus, A.P., Lee, K.E., Ling, A.E., Chew, S.K., Ang, B., Rollin, P.E., Umapathi, T., Sng, I., Lee, C.C., Lim, E. and Ksiazek, T.G. (1999). Outbreak of Nipah-virus infection among abattoir workers in Singapore. *Lancet*, 354: 1253 -1256.

Patterson, J. B.; Thomas, D.; Lewicki, H.; Billeter, M. A.; Oldstone, M. B. (2000). V and C proteins of measles virus function as virulence factors in vivo. *J. Virology*, 267: 80 - 89.

Permar, S. R.; Moss, W. J.; Ryon, J. J.; Douek, D. C.; Monze, M.; Griffin, D. E. (2003). Increased thymic output during acute measles virus infection. *Journal of virology*, 14: 7872 - 7879.

Pileri P, Uematsu Y, Campagnoli S, Galli G, Falugi F, Petracca R, Weiner AJ, Houghton M, Rosa D, Grandi G, Abrignani S. (1998). Binding of hepatitis C virus to CD81. *Science*, 282: 938 - 941.

Pique, C., C. Lagaudriere-Gesbert, L. Delamarre, A. R. Rosenberg, H. Conjeaud, and M. C. Dokhelar (2000). Interaction of CD82 tetraspanin proteins with HTLV-1 envelope glycoproteins inhibits cell-to-cell fusion and virus transmission. *Virology*, 276: 455 - 461.

Plempner R.K, Compans RW (2003). Mutations in the putative HR-C region of the measles virus F2 glycoprotein modulate Synzytium formation. *J Virol.*; 77: 4181 - 90.

Plempner R.K, Doyle J, Sun A, Prussia A, Cheng LT, Rota PA, Liotta DC, Snyder JP, Compans RW (2005). Design of a small-molecule entry inhibitor with activity against primary measles virus strains. *Antimicrob Agents Chemother*, 49: 3755 - 61.

Plempner, R.K, Erlandson, K. J., Lakdawala, A. S., Sun, A. , Prussia, A. , Boonsombat, J. , Aki-Sener, E. , Yalcin, I. , Yildiz, I. , Temiz-Arpaci, O. , Tekiner, B. , Liotta, D. C. , Snyder, J. P. , Compans, R. W (2004) . A target site for template-based design of measles virus entry inhibitors, *PNAS* 101: 5628 – 33.

Poluri A, Ainsworth R, Weaver SC, Sutton R. Functional pseudotyping of human immunodeficiency virus type 1 vectors by Western equine encephalitis virus envelope glycoprotein. *J Virol.*, 82:12580 – 4.

Porotto M, Carta P, Deng Y, Kellogg GE, Whitt M, Lu M, Mungall BA, Moscona A (2007). Molecular determinants of antiviral potency of paramyxovirus entry inhibitors. *J Virol.*, 81: 10567 - 74.

Porotto, M., L. Doctor, P. Carta, M. Fornabaio, O. Greengard, G. E. Kellogg, and A. Moscona (2006). Inhibition of Hendra virus fusion. *J. Virol.*, 80: 9837 - 9849.

Pringle, C. R. (1991). The order Mononegavirales. *Arch Virol*, 117: 137 - 140.

promedmail.org: DENGUE/DHF UPDATE 2006 (37).

Public Health Foundation; Kapitel Measles, Mumps und Rubella. In: *Epidemiology & Prevention of Vaccine-Preventable Diseases - "The Pink Book"*; 9th Edition 131 – 170.

Q

Qureshi NM, Coy DH, Garry RF, Henderson LA (1990). Characterization of a putative cellular receptor for HIV-1 transmembrane glycoprotein using synthetic peptides. *AIDS*; 4: 553 - 8.

R

Ramos-Castaneda J, Imbert JL, Barron BL, Ramos C (1997). 65-kDa trypsin-sensible membrane cell protein as a possible receptor for dengue virus in cultured neuroblastoma cells. *J Neurovirol.*, 3: 435 - 440.

Rapaport, D., M. Ovadia, and Y. Shai. (1995). A synthetic peptide corresponding to a conserved Heptad repeat domain is a potent inhibitor of Sendai virus-cell fusion: an emerging similarity with functional domains of other viruses. *EMBO J.*, 14: 5524 - 5531.

Ray, J., and Fujinami, R.S. (1987). Characterization of in vitro transcription and transcriptional products of measles virus. *J Virol*. 61: 3381 - 3387.

Reeves, J. D., F. H. Lee, J. L. Miamidian, C. B. Jabara, M. M. Juntilla, and R. W. Doms. (2005). Enfuvirtide resistance mutations: impact on human immunodeficiency virus envelope function, entry inhibitor sensitivity, and virus neutralization. *J. Virol.*, 79: 4991 - 4999.

Ren G, Wang Z, Wang G, Song Y, Yao P, Xu H, Wen H, Zhang W (2006). Effects of Heptad repeat Regions of F Protein on the Specific Membrane Fusion in Paramyxoviruses. *Intervirology*, 49: 299 - 306.

Reuter T, Weissbrich B, Schneider-Schaulies S, Schneider-Schaulies J. (2006). RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription. *J Virol.*, 80: 5951 - 7.

Rey FA, Heinz FX, Mandl C, Kunz C, Harrison SC (1995). The envelope glycoprotein from tick-borne encephalitis virus at 2 Å resolution. *Nature*, 375: 291 - 8.

Rey, FA (2003). Dengue virus envelope glycoprotein structure: new insight into its interactions during viral entry. *PNAS*, 100: 6899 - 6901.

Reynes, J.M., Counor, D., Ong, S., Faure, C., Seng, V., Molia, S., Walston, J., Georges-Courbot, M.C., Deubel, V. and Sarthou, J.L. (2005) Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg Infect Dis*, 11: 1042 - 1047.

Richardson CD, Choppin PW (1983). Oligopeptides that specifically inhibit membrane fusion by paramyxoviruses: studies on the site of action. *Virology*, 131: 518 - 32.

Rima BK, Duffy N, Mitchell WJ, Summers BA, Appel MJ (1991). Correlation between humoral immune responses and presence of virus in the CNS in dogs experimentally infected with canine distemper virus. *Arch Virol.*, 121: 1 - 8.

Rima, B., Alexander, DJ, Billeter; MA, Collins, PL, Kingsbury, DW, Lipkind, MA, Nagai, Y, Orvell, C, Pringle, CR, ter Meulen, V. (1995). Family Paramyxoviridae. In *Virus taxonomy*, Sixth report of the international committee on taxonomy of viruses. Springer-Verlag, 268 - 274.

RKI-Ratgeber Infektionskrankheiten - Masern. Merkblätter für Ärzte. Robert-Koch-Institut. Stand 01 und 08/2006.

Rodriguez, J. J., Cruz, C.D. and Horvath, C.M. (2004). Identification of the nuclear export signal and STAT-binding domains of the Nipah virus V protein reveals mechanisms underlying interferon evasion. *J Virol*, 78: 5358 - 5367.

Rodriguez, J.J., Parisien, J.P. and Horvath, C.M. (2002). Nipah virus V protein evades alpha and gamma interferons by preventing STAT1 and STAT2 activation and nuclear accumulation. *J Virol*, 76: 11476 - 11483.

- Rota, P.A. (2000). Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology*, 271: 334 - 349.
- Rubinstein, E., F. Le Naour, C. Lagaudriere-Gesbert, M. Billard, H. Conjeaud, and C. Boucheix (1996). CD9, CD63, CD81, and CD82 are components of a surface tetraspan network connected to HLA-DR and VLA integrins. *Eur. J. Immunol.*, 26: 2657 - 2665.
- Runge KE, Evans JE, He ZY, Gupta S, McDonald KL, Stahlberg H, Primakoff P, Myles DG (2007). Oocyte CD9 is enriched on the microvillar membrane and required for normal microvillar shape and distribution. *Dev Biol*; 304: 317 - 25.
- Rusconi S, Scozzafava A, Mastrolorenzo A, Supuran CT (2007). An update in the development of HIV entry inhibitors. *Curr Top Med Chem.*; 7: 1273 - 89.
- Russell, C. J., and L. E. Luque. (2006). The structural basis of paramyxovirus invasion. *Trends Microbiol.*, 14: 243 - 246.
- Russell, C. J., Kantor K. L., Jardetzky T. S., and Lamb R. A. (2003). A dual-functional paramyxovirus F protein regulatory switch segment: activation and membrane fusion. *J. Cell Biol.*, 163: 363 - 374.
- Russell, C. J., Jardetzky T. S., and Lamb R. A. (2001). Membrane fusion machines of paramyxoviruses: capture of intermediates of fusion. *EMBO J.*, 20: 4024 - 4034.
- Russell, P. K.; McCown, J. M. (1972). Comparison of dengue-2 and dengue-3 virus strains by neutralization tests and identification of a subtype of dengue-3. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 2: 97 - 99.

S

- Schaper S. (2001) „Beitrag zur Verwendung von Mesocyclops thermocyclopoides für die Bekämpfung der Stechmücke *Aedes aegypti* in Costa Rica“. Dissertation Hannover, ISBN-10: 3831116687.
- Sakaguchi, M.; Yoshikawa, Y.; Yamanouchi, K.; Sata, T.; Nagashima, K.; Takeda, K. (1986). Growth of measles virus in epithelial and lymphoid tissues of cynomolgus monkeys. *Microbiology and immunology*, 10: 1067 - 1073.
- Sakoonwatanyoo P, Boonsanay V, Smith DR (2006). Growth and production of the dengue virus in C6/36 cells and identification of a laminin-binding protein as a candidate serotype 3 and 4 receptor protein. *Intervirology*, 49: 161 - 172.
- Salas-Benito JS, Del Angel RM (1997). Identification of two surface proteins from C6/36 cells that bind dengue type 4 virus. *J Virol*, 71: 7246 - 7252.
- Sala-Valdes M, Ursa A, Charrin S, Rubinstein E, Hemler ME, Sanchez-Madrid F, Yanez-Mo M (2006). EWI-2 and EWI-F link the tetraspanin web to the actin cytoskeleton through their direct association with ezrin-radixin-moesin proteins. *J Biol Chem*; 281: 19665 - 19675.
- Santilli G, Thornhill SI, Kinnon C, Thrasher AJ (2008). Gene therapy of inherited immunodeficiencies; *Expert Opin Biol Ther.*, 8: 397 - 407.
- Scheid, A. and Choppin, P.W. (1974). Identification of biological activities of paramyxovirus glycoproteins. Activation of cell fusion, hemolysis, and infectivity of proteolytic cleavage of an inactive precursor protein of Sendai virus. *Virology*, 57: 475 - 490.
- Schibli DJ, Weissenhorn W (2004). Class I and class II viral fusion protein structures reveal similar principles in membrane fusion. *Mol Membr Biol.*, 21: 361 - 71.
- Schmid E (2001), Die Rolle des CD9 bei der CDV-Infektion; Dissertation.
- Schmid E., Zurbriggen A., Gassen U., Rima B., terMeulen V., and Schneider- Schaulies J. (2000). Antibodies to CD9, a Tetraspan Transmembrane Protein, inhibit Canine Distemper Virus-induced Cell-Cell Fusion but not Virus-Cell Fusion. *J. Virol*, 74: 7554 - 7561.
- Schneider, U.; Bullough, F.; Vongpunsawad, S.; Russell, S. J.; Cattaneo, R. (2000). Recombinant measles viruses efficiently entering cells through targeted receptors. *Journal of virology*, 21: 9928 - 9936.
- Schneider-Schaulies J, Dunster LM, Schwartz -Albiez R, Krohne G and ter Meulen V (1995). Physical association of moesin and CD46 as a receptor complex for measles virus. *J Virol.*, 69: 2248 - 56.
- Schneider-Schaulies J, ter Meulen V, Schneider-Schaulies S (2003). Measles infection of the central nervous system. *J Neurovirol*, 9: 247 - 252.
- Schneider-Schaulies J. (2000). Cellular receptors for viruses: links to tropism and pathogenesis. *J Gen Virol.*, 81: 1413 - 29.
- Schneider-Schaulies, S., Liebert, U. G., Bacsko, K. and ter Meulen, V. (1990). Restricted expression of measles virus in primary rat astroglial cells. *Virology*, 177: 802 - 806.
- Seehafer, J.G., and A.R. Shaw. (1991). Evidence that the signal-initiating membrane protein CD9 is associated with small GTP-binding proteins. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 179: 401 - 406.

- Shaw, A. R. E., A. Domanska, A. Mak, A. Gilchrist, K. Dobler, L. Visser, S. Poppema, L. Fliegel, M. Letarte, and B.J. Willett (1995). Ectopic expression of human and feline CD9 in a human B cell line confers b 1 integrin-dependent motility on fibronectin and laminin substrates and enhanced tyrosine phosphorylation. *J. Biol. Chem.*, 270: 24092 - 24099.
- Shaw, M. L., Garcia-Sastre, A., Palese, P. and Basler, C. F. (2004). Nipah virus V and W proteins have a common STAT1-binding domain yet inhibit STAT1 activation from the cytoplasmic and nuclear compartments, respectively. *J Virol*, 78: 5633 - 5641.
- Shaw, M.L., Cardenas, W. B., Zamarin, D., Palese, P. and Basler, C. F. (2005). Nuclear localization of the Nipah virus W protein allows for inhibition of both virus- and toll-like receptor 3-triggered signaling pathways. *J Virol*, 79: 6078 - 6088.
- Shinnick TM, Lerner RA, Sutcliffe JG (1981). Nucleotide sequence of Moloney murine leukaemia virus. *Nature*, 293: 543 - 8.
- Shu PY, Chen LK, Chang SF, Yueh YY, Chow L, Chien LJ, Chin C, Lin TH, Huang JH (2000). Dengue NS1-specific antibody responses: isotype distribution and serotyping in patients with Dengue fever and Dengue hemorrhagic fever. *J Med Virol.*, 62: 224 - 32
- Si Z and Hersey P (1993). Expression of the neuroglandular antigen and analogues in melanoma. CD9 expression appears inversely related to metastatic potential of melanoma. *International Journal of Cancer* 54: 37 - 43.
- Signoret, N., Poignard, P., Blanc, D., Sattenau, Q. J. (1993). Human and simian immunodeficiency viruses: virus-receptor interactions. *Trends Microbiol.*, 1: 328 - 33.
- Silver Jared N, Flotte Terence R (2008). Towards a rAAV-based gene therapy for ADA-SCID: from ADA deficiency to current and future treatment strategies. *Pharmacogenomics*, 9: 947 – 968.
- Singethan K, Müller N, Schubert S, Lüttge D, Kremontsov DN, Khurana SR, Krohne G, Schneider-Schaulies S, Thali M, Schneider-Schaulies J (2008). CD9 clustering and formation of microvilli zippers between contacting cells regulates virus-induced cell fusion. *Traffic*, 9: 924 - 35.
- Singethan, K., Topfstedt E., Schubert S., Duprex W. P., Rima B. K. and Jürgen Schneider-Schaulies (2006). CD9-dependent regulation of Canine distemper virus-induced cell - cell fusion segregates with the extracellular domain of the haemagglutinin. *Journal of General Virology* 87: 1635 - 1642.
- Sips GJ, Chesik D, Glazenburg L, Wilschut J, De Keyser J, Wilczak N (2007). Involvement of morbilliviruses in the pathogenesis of demyelinating disease. *Rev Med Virol*, 17: 223 - 244.
- Skehel, J.J. and Wiley, D.C. (2000). Receptor binding and membrane fusion in virus entry: the influenza hemagglutinin. *Annu Rev Biochem*, 69: 531 - 569.
- Slifka, M.K., D. Homann, A. Tishon, R. Pagarigan, and M.B. Oldstone (2003). Measles virus infection results in suppression of both innate and adaptive immune responses to secondary bacterial infection. *J. Clin. Virol.*, 63: 2072 - 2080.
- Smit JM, Bittman R, Wilschut J. (1999). Low-pH-dependent fusion of Sindbis virus with receptor-free cholesterol- and sphingolipid-containing liposomes. *J Virol.*, 73: 8476 - 84.
- Soneoka Y, Cannon PM, Ramsdale EE, Griffiths JC, Romano G, Kingsman SM, Kingsman AJ (1995). A transient three-plasmid expression system for the production of high titer retroviral vectors. *Nucleic Acids Res.*, 23: 628 - 33.
- Stallcup KC, Raine CS, Fields BN (1983). Cytochalasin B inhibits the maturation of measles virus. *Virology*, 124: 59 – 74.
- Stauffer F, Melo MN, Carneiro FA, Sousa FJ, Juliano MA, Juliano L, MohanA - Borges R, Da Poian AT, Castanho MA (2008). Interaction between dengue virus fusion peptide and lipid bilayers depends on peptide clustering. *Mol Membr Biol.*, 25: 128 -38.
- Stern, L. B.- L., M. Greenberg, J. M. Gershoni, and S. Rozenblatt (1995). The haemagglutinin envelope protein of canine distemper virus (CDV) confers cell tropism as illustrated by CDV and measles virus complementation analysis. *J Virol.*, 69: 1661 - 8.
- Stettler, M., Beck, K., Wagner, A., Vandeveldel., M und Zurbriggen, A. (1997). Determinants of persistence in canine distemper viruses. *Vet. Microbiol.*, 57: 83 - 93.
- Stiasny K, Allison SL, Marchler-Bauer A, Kunz C, Heinz FX (1996). Structural requirements for low-pH-induced rearrangements in the envelope glycoprotein of tick-borne encephalitis virus. *J Virol*, 70: 8142 - 8147.
- Stiasny K, Kössl C, Lepault J, Rey FA, Heinz FX (2007). Characterization of a structural intermediate of flavivirus membrane fusion. *PLoS Pathog.*, 3: e20.
- Stipp CS, Kolesnikova TV, Hemler ME (2001). EWI-2 is a major CD9 and CD81 partner and member of a novel Ig protein subfamily. *J Biol Chem*; 276: 40545 - 40554.
- Stipp, C. S., T. V. Kolesnikova, and M. E. Hemler (2003). Functional domains in tetraspanin proteins. *Trends Biochem. Sci.*, 28: 106 - 112.

Suryanarayana, K.; Bacsko, K.; ter, Meulen V.; Wagner, R. R. (1994): Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue. *Journal of virology*, 3: 1532 - 1543.

Szollosi, J., V. Horejsi, L. Bene, P. Angelisova, and S. Damjanovich (1996). Supramolecular complexes of MHC class I, MHC class II, CD20, and tetraspan molecules (CD53, CD81, and CD82) at the surface of a B cell line JY. *J. Immunol.*, 157: 2939 - 2946.

T

Tahara, Maino, Makoto Takeda, Yuta Shirogane, Takao Hashiguchi, Shinji Ohno, and Yusuke Yanagi (2008). Measles Virus Infects both Polarized Epithelial and Immune Cells by Using Distinctive Receptor-Binding Sites on Its Hemagglutinin. *Journal of Virology*, 82: 4630 - 4637..

Tai, X.G., Y. Yashiro, R. Abe, K. Toyo-oka, C.R. Wood, J. Morris, A. Long, S. Ono, M. Kobayashi, T. Hamaoka (1996). A role for CD9 molecules in T cell activation. *J. Exp. Med.*, 184: 753 - 758.

Tajima M, Kudow S. Morphology of the Warthin-Finkeldey giant cells in monkeys with experimentally induced measles (1976). *Acta Pathol Jpn.*; 26: 367 - 80.

Takeda Y, Tachibana I, Miyado K, Kobayashi M, Miyazaki T, Funakoshi T, Kimura H, Yamane H, Saito Y, Goto H, Yoneda T, Yoshida M, Kumagai T, Osaki T, Hayashi S, et al. (2003). Tetraspanins CD9 and CD81 function to prevent the fusion of mononuclear phagocytes. *J Cell Biol.*, 161: 945 - 956.

Takimoto, T. and Portner, A. (2004). Molecular mechanism of paramyxovirus budding. *Virus Res*, 106: 133 - 145.

Takimoto, T., G. L. Taylor, H. C. Connaris, S. J. Crennell, and A. Portner (2002). Role of the hemagglutinin-neuraminidase protein in the mechanism of paramyxovirus-cell membrane fusion. *J. Virol.*, 76: 13028 - 13033.

Tamin, A., Harcourt, B.H., Ksiazek, T.G., Rollin, P.E., Bellini, W.J. and Rota, P.A. (2002). Functional properties of the fusion and attachment glycoproteins of Nipah virus. *Virology*, 296: 190 - 200.

Tan CT und Wong KT (2003). Nipah encephalitis outbreak in Malaysia. *Ann Acad Med Singapore*, 32: 112 - 117.

Tan, C. T., Goh, K.J., Wong, K.T., Sarji, S.A., Chua, K.B., Chew, N.K., Murugasu, P., Loh, Y.L., Chong, H.T., Tan, K.S., Thayaparan, T., Kumar, S. and Jusoh, M.R. (2002). Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. *Ann Neurol.*, 51: 703 - 708.

Tashiro, M., Yokogoshi, Y., Tobita, K., Seto, J.T., Rott, R. and Kido, H. (1992). Trypsin Clara, an activating protease for Sendai virus in rat lungs, is involved in pneumopathogenicity. *J Virol*, 66: 7211 - 7216.

Tassaneeritthep B, Burgess TH, Granelli-Piperno A, Trumpfheller C, Finke J, Sun W, Eller MA, Pattanapanyasat K, Sarasombath S, Birx DL, Steinman RM, Schlesinger S, Marovich MA (2003). DC-SIGN (CD209) mediates dengue virus infection of human dendritic cells. *J Exp Med*, 197: 823 - 829.

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

Tatsuo H, Yanagi Y., (2002). The morbillivirus receptor SLAM (CD150). *Microbiol. Immunol.*, 46: 135 - 42.

Tatsuo H., Ono N., and Yanagi, Y. (2001). Morbilliviruses use signaling lymphocyte activation molecules (CD150) as cellular receptors. *J. Virol.*, 75: 5842 - 5850.

Taylor J, Pincus S, Tartaglia J, Richardson C, Alkhatib G, Briedis D, Appel M, Norton E, Paoletti E (1991). Vaccinia virus recombinants expressing either the measles virus fusion or hemagglutinin glycoprotein protect dogs against canine distemper virus challenge. *J Virol.*, 65: 4263 - 74.

Ter Meulen, V., Kreth, H. W. and Carter, M. J. (1982). Immunological aspects of slow virus infections of the nervous system. *Clinics in Immunology and Allergy* 2: 425 - 456.

Ter Meulen, V., Stephanson, J. R. und Kreth, H. W., Fraenkel-Conrath, H., Wagner, R. R. (1983). Subacute sclerosing panencephalitis. *Compr. Virol.*, 18: 105 - 159.

Tidona C., H. W. Kurz, H. Gelderblom, G. Darai (1998). Tupaja Paramyxovirus. Poster auf der Tagung der GFV in Regensburg.

Tober, C.; Seufert, M.; Schneider, H.; Billeter, M. A.; Johnston, I. C.; Niewiesk, S. et al. (1998): Expression of measles virus V protein is associated with pathogenicity and control of viral RNA synthesis. *Journal of virology*, 10: 8124 - 132.

Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *PNAS*, 76: 4350 - 4.

Turville SG, Cameron PU, Handley A, Lin G, Pohlmann S, Doms RW, et al. (2002). Diversity of receptors binding HIV on dendritic cell subsets. *Nat Immunol.*, 3: 975 - 983.

Tyrrell D. L., Norrby E (1978). Structural polypeptides of measles virus. *J Gen Virol.*, 39: 219 - 229.

Tyrrell, D. L.; Ehrnst, A. (1979). Transmembrane communication in cells chronically infected with measles virus. *The Journal of cell biology*, 2: 396 - 402.

U

Utama, A.; Shimizu, H.; Morikawa, S.; Hasebe, F.; Morita, K.; Igarashi, A. et al. (2000). Identification and characterization of the RNA helicase activity of Japanese encephalitis virus NS3 protein. *FEBS letters*, 1: 74 - 78.

V

Van Bogaert, L. and Innes, J. R. M. (1962). Subacute diffuse sclerosing encephalitis in the dog. *Comperative Neuropathology*. Ed. Innes and Saunders, Academic Press, 394.

Van de Bildt MW, Kuiken T, Visee AM, Lema S, Fitzjohn TR, Osterhaus AD (2002). Distemper outbreak and its effect on African wild dog conservation. *Emerg Infect Dis.*, 211 - 3.

Vile, R. G.; Russell, S. J. (1995): Retroviruses as vectors. *British medical bulletin*, 1: 12 - 30.

Visser, I. K., M. F. van Bresseem, T. Barrett, and A. D. Osterhaus (1993). Morbillivirus infections in aquatic mammals. *Vet. Res.*, 24: 169 - 178.

Vlasak, R., Luytjes, W., Spaa, W., and Palese, P. (1988). Human and bovine coronaviruses recognize sialic acid-containing receptors similar to those of influenza C virus. *PNAS*, 85: 4526.

Vogt, A. B., S. Spindeldreher, and H. Kropshofer (2002). Clustering of MHC-peptide complexes prior to their engagement in the immunological synapse: lipid raft and tetraspan microdomains. *Immunol. Rev.*, 189: 131 - 151.

Von Messling, V., Milosevic, D., Deveaux, P., and Cattaneo, R. (2004). Canine distemper virus and measles virus fusion glycoprotein trimers: partial membrane-proximal ectodomain cleavage enhances function. *J Virol.*, 78: 7894 - 903.

Vulliamoz, D. and Roux, L. (2001) "Rule of six": how does the Sendai virus RNA polymerase keep count? *J Virol*, 75: 4506 - 4518.

W

Wacharapluesadee S, Hemachudha T (2006). Duplex nested RT-PCR for detection of Nipah virus RNA from urine specimens of bats. *J Virol Methods*, 141: 97 - 101.

Wacharapluesadee, S., Lumlertdacha, B., Boongird, K., Wanghongsa, S., Chanhom, L., Rollin, P., Stockton, P., Rupprecht, C. E., Ksiazek, T.G. and Hemachudha, T. (2005). Bat Nipah virus, Thailand. *Emerg Infect Dis*, 11: 1949 - 1951.

Wang, L. F., Yu, M., Hansson, E., Pritchard, L.I., Shiell, B., Michalski, W.P. and Eaton, B.T. (2000). The exceptionally large genome of Hendra virus: support for creation of a new genus within the family Paramyxoviridae. *J Virol*, 74: 9972 - 9979.

Wang, L., Harcourt, B.H., Yu, M., Tamin, A., Rota, P.A., Bellini, W.J. and Eaton, B.T. (2001). Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect*, 3: 279 - 287.

Warden D, Thorne HV. (1968). The infectivity of polyoma virus DNA for mouse embryo cells in the presence of diethylaminoethyl-dextran. *J Gen Virol.*, 3: 371 - 7.

Watanabe, S; Takada, A; Watanabe, T; Ito, H; Kida, H; Kawaoka, Y (2000). Functional importance of the coiled-coil of the Ebola virus glycoprotein. *J Virol.*, 74: 10194 - 10201.

Weingartl HM, Berhane Y, Caswell JL, et al. (2006): Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge. *Journal of Virology*, 80: 7929 - 7938.

Weissenhorn W, Hinz A, Gaudin Y (2007). Virus membrane fusion. *FEBS Lett.*, 581: 2150 - 5.

Wenzlow N., P. Plattet, R. Wittek, A. Zurbriggen and A Gröne (2007). Immunohistochemical Demonstration of the Putative Canine Distemper Virus Receptor CD150 in Dogs with and without Distemper; *Vet Pathol.*, 44: 943 - 948.

White SH, Snider C, Jaysinghe S, Kim J. Membrane Protein Explorer version 2.2a; <http://blancobiomoluciedu/mpex/2003>

WHO, fact sheet Dengue Virus, (2008); <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs117/en>

Wild TF, Buckland R. (1997). Inhibition of measles virus infection and fusion with peptides corresponding to the leucine zipper region of the fusion protein. *J Gen Virol.* 78: 107 - 11. .

Wild, C. T., Shugars D. C., Greenwell T. K., McDanal C. B., and Matthews T. J. (1994). Peptides corresponding to a predictive alpha-helical domain of human immunodeficiency virus type 1 gp41 are potent inhibitors of virus infection. *PNAS*, 91: 9770 - 9774.

- Wild, C., Oas T., McDanal C., Bolognesi D., and Matthews T. (1992). A synthetic peptide inhibitor of human immunodeficiency virus replication: correlation between solution structure and viral inhibition. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 10537 - 10541.
- Wild, C; Greenwell, T; Matthews, T. (1993). A synthetic peptide from HIV-1 gp41 is a potent inhibitor of virus-mediated cell-cell fusion. *AIDS Research & Human Retroviruses*, 9: 1051 - 1053.
- Wild, T. F.; Buckland, R. (1995): Functional aspects of envelope-associated measles virus proteins. *Current topics in microbiology and immunology*, 191: 51 - 64.
- Wild, T.F., Malvoisin, E., and Buckland R. (1991). Measles virus: both haemagglutinin and fusion glycoproteins are required for fusion. *J. Virol.*, 72: 439 - 442.
- Wilson, IA; Skehel, JJ; Wiley, DC (1981). Structure of the haemagglutinin membrane glycoprotein of influenza virus at 3 Å resolution. *Nature*, 289: 366 - 373.
- Wong S., S. Lau, P. Woo und KY Yuen (2006): Bats as a continuing source of emerging infections in humans. *Rev Med Virol.*, 17: 67 - 91.
- Wong, K. T., Shieh, W. J., Kumar, S., Norain, K., Abdullah, W., Guarner, J., Goldsmith, C. S., Chua, K. B., Lam, S. K., Tan, C. T., Goh, K. J., Chong, H. T., Jusoh, R., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G. and Zaki, S.R. (2002). Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis. *Am J Pathol*, 161: 2153 - 2167.
- Wong, K.T., Shieh, W.J., Zaki, S.R. and Tan, C.T. (2002). Nipah virus infection, an emerging paramyxoviral zoonosis. *Springer Semin Immunopathol*, 24: 215 - 228.

X

- Xu, Y., Gao, S., Cole, D.K., Zhu, J., Su, N., Wang, H., Gao, G.F. and Rao, Z. (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.

Y

- Yang, Y.; Vanin, E. F.; Whitt, M. A.; Fornerod, M.; Zwart, R.; Schneiderman, R. D. et al. (1995): Inducible, high-level production of infectious murine leukemia retroviral vector particles pseudotyped with vesicular stomatitis virus G envelope protein. *Human gene therapy*, 6: 1203 - 1213.
- Yao, Q., and R. W. Compans. 1996. Peptides corresponding to the Heptad repeat sequence of human parainfluenza virus fusion protein are potent inhibitors of virus infection. *J. of Virology*, 223: 103 - 112.
- Yatomi, Y., M. Higashihara, Y. Ozaki, S. Kume, and K. Kurokawa (1990). Intracellular ionized calcium mobilization of CD9 monoclonal antibody-activated human platelets. *Biochem. Biophys. Res. Com.*, 171: 109 - 115.
- Yauch, R. L., A. R. Kazarov, B. Desai, R. T. Lee, and M. E. Hemler (2000). Direct extracellular contact between integrin $\alpha(3)\beta(1)$ and TM4SF protein CD151. *J. Biol. Chem.*, 275: 9230 - 9238.
- Yauch, R. L., and M. E. Hemler. (2000). Specific interactions among transmembrane 4 superfamily (TM4SF) proteins and phosphoinositide 4-kinase. *Biochem. J.*, 351: 629 - 637.
- Yin, H-S., Wen, X., Paterson, R. G., Lamb, R. A., Jardetzky, T. S. (2006). Structure of the parainfluenza virus 5 F protein in its metastable, prefusion conformation. *Nature*, 439: 38 - 44.
- Yob, J.M., Field, H., Rashdi, A.M., Morrissy, C., van der Heide, B., Rota, P., bin Adzhar, A., White, J., Daniels, P., Jamaluddin, A. and Ksiazek, T. (2001). Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsula Malaysia. *Emerg Infect Dis*, 7: 439 - 441.
- Yoon JJ, Chawla D, Paal T, Ndungu M, Du Y, Kurtkaya S, Sun A, Snyder JP, Plemper RK (2008). High-throughput screening-based identification of paramyxovirus inhibitors. *J Biomol Screen*, 13: 591 - 608.
- Young JK, Hicks RP, Wright GE, Morrison TG (1997). Analysis of a peptide inhibitor of paramyxovirus (NDV) fusion using biological assays, NMR, and molecular modeling. *J. of Virology*, 238: 291 - 304.
- Young, JK; Li, D; Abramowitz, MC; Morrison, TG (1999). Interaction of peptides with sequences from the Newcastle disease virus fusion protein Heptad repeat regions. *J Virol.*; 73: 5945 - 5956.
- Young, P. R.; Hilditch, P. A.; Bletchly, C.; Halloran, W. (2000). An antigen capture enzyme-linked immunosorbent assay reveals high levels of the dengue virus protein NS1 in the sera of infected patients. *Journal of clinical microbiology*, 3: 1053 - 1057.
- Yu IM, Zhang W, Holdaway HA, Li L, Kostyuchenko VA, Chipman PR, Kuhn RJ, Rossmann MG, Chen J (2008). Structure of the immature dengue virus at low pH primes proteolytic maturation. *Science.*, 319: 1834 - 7.

Yusof, R.; Clum, S.; Wetzell, M.; Murthy, H. M.; Padmanabhan, R. (2000). Purified NS2B/NS3 serine protease of dengue virus type 2 exhibits cofactor NS2B dependence for cleavage of substrates with dibasic amino acids in vitro. *The Journal of biological Chemistry*, 14: 9963 - 9969.

Z

Zaitseva E, Mittal A, Griffin DE, Chernomordik LV (2005). Class II fusion protein of alphaviruses drives membrane fusion through the same pathway as class I proteins. *J Cell Biol.*, 169: 167 - 177.

Zhang Y, Zhang W, Ogata S, Clements D, Strauss JH, Baker TS, Kuhn RJ, Rossmann MG (2004). Conformational changes of the flavivirus E glycoprotein. *Structure*; 12: 1607 - 18.

Zilber MT, Setterblad N, Vasselon T, Doliger C, Charron D, Mooney N, Gelin C. (2005). MHC class II/CD38/CD9: a lipid-raft-dependent signaling complex in human monocytes; *Blood*, 106: 3074 - 81.

Ziyyat A, Rubinstein E, Monier-Gavelle F, Barraud V, Kulski O, Prenant M, Boucheix C, Bomsel M, Wolf JP (2006). CD9 controls the formation of clusters that contain tetraspanins and the integrin alpha 6 beta 1, which are involved in human and mouse gamete fusion. *J Cell Sci.*, 119: 416 - 24.

Závada J. (1982). The pseudotypic paradox. *J Gen Virol.*, 63: 15 - 24.

10 Posterpräsentationen, Vorträge und Publikationen

- 2004 Teilnahme am GFV Joint Meeting in Tübingen mit der „Società Italiana di Virologia“ und Posterpräsentation mit dem Titel “Haemagglutinin and fusion protein contribute differentially to CD9-mediated regulation of Canine Distemper Virus- induced cell fusion”.
- 2004 Teilnahme am XIV. Measles Meeting in Würzburg mit der Präsentation “CD9 regulation of canine distemper virus (CDV)-induced cell fusion”.
- 2005 Teilnahme am Annual Meeting GFV in Hannover und Posterpräsentation mit dem Titel „CD9-mediated regulation of Canine Distemper Virus-induced cell fusion is determined by the haemagglutinin“.
- 2005 Teilnahme am XV. Measles Meeting in Würzburg mit der Präsentation „CD9-dependent regulation of CDV-induced cell fusion segregates with the extracellular domain of the haemagglutinin“.
- 2006 Teilnahme am Annual Meeting GFV in München und Posterpräsentation mit dem Titel „A mouse model of persistent brain infection with recombinant measles virus“.
- 2006 Veröffentlichung im Journal of General Virology “CD9-dependent regulation of Canine distemper virus-induced cell–cell fusion segregates with the extracellular domain of the haemagglutinin”, *K. Singethan, E. Topfstedt, S. Schubert, W. P. Duprex, B. K. Rima and Jürgen Schneider-Schaulies; J.Gen.Virol., 87: 1635 – 42.*
- 2006 Veröffentlichung im Journal of General Virology “A mouse model of persistent brain infection with recombinant Measles virus”; *S. Schubert, K. Möller-Ehrlich, K. Singethan, S. Wiese, W. P. Duprex, B. K. Rima, S. Niewiesk and J. Schneider-Schaulies; J.Gen.Virol., 87: 2011 – 9.*
- 2007 Präsentation „CD9 antibodies inhibit virus induced cell-to-cell-fusion of CDV and induce microvilli-like structures on cell boarders“ am Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- 2007 Teilnahme am XVII. Measles Meeting in Würzburg mit der Präsentation „CD9 clustering and formation of microvilli zippers between contacting cells regulates virus-induced cell fusion“.
- 2008 Teilnahme am Annual Meeting GFV in Heidelberg und Posterpräsentation mit dem Titel „CD9-clustering and formation of microvilli zippers between contacting cells regulates virus-induced cell fusion“.
- 2008 Präsentation „Development of a test system for small inhibitors against Dengue, Measles and Nipah Virus Uptake“ am Institut für Virologie und Immunbiologie der Bayerischen Julius-Maximilians-Universität Würzburg.
- 2008 Veröffentlichung in Traffic “CD9- clustering and formation of microvilli zippers between contacting cells regulates virus-induced cell fusion”, *Katrin Singethan, Nora Müller, Sabine Schubert, Doreen Lüttge, Dimitry N. Kremmentsov, Sandhya R. Khurana, Georg Krohne, Sibylle Schneider-Schaulies, Markus Thali and Jürgen Schneider-Schaulies; Traffic, 9: 924 – 35.*
- 2008 Article Addendum in Communicative & Integrative Biology “Tetraspanins – Small transmembrane proteins with big impact on membrane microdomain structures”, *Katrin Singethan and Jürgen Schneider-Schaulies; CIB, 1: 11 – 13.*
- 2008 Einreichen des Papers im Journal of Medicinal Chemistry “A small molecule inhibitor of Nipah virus envelope protein-mediated membrane fusion”; *Sabine Niedermeier, Katrin Singethan, Sebastian G. Rohrer, Magnus Matz, Markus Kossner, Sandra Diederich, Andrea Maisner, Jens Schmitz, Knut Baumann, Ulrike Holzgrabe, and Jürgen Schneider-Schaulies.*

Mein persönlicher Dank gilt...

- meinem Chef, Prof. Dr. Jürgen Schneider-Schaulies, für die Betreuung meiner Arbeit, die freundliche, lange und gute Zusammenarbeit und dafür, dass er mir stets ein guter Gesprächs- und Diskussionspartner war.
- Herrn Prof. Dr. Georg Krohne für die Übernahme der Zweit-Korrektur und die Unterstützung mit den REM-Präparaten.
- Dr. Sandra Diederich für die Arbeiten mit NiV im S4-Labor im Institut für Virologie in Marburg und für die Betreuung während meines Arbeitsaufenthalts in Marburg.
- Dr. Nora Müller für die Hilfe und unendliche Zeitinvestition beim Arbeiten am konfokalen Mikroskop.
- besonderer Dank gilt meinem Lebensgefährten, der mir ein weiteres Mal in einer schwierigen Situation meines Lebens zur Seite stand und mir wieder einmal mit Formatierungen, Prüfungs- und Alltagsproblemen geholfen hat.
- meiner Oma und Tante Lissy, die mich stets unterstützen und ermutigen; vor allem aber ein riesiges Dankeschön an Tante Lissy, die ein weiteres Mal mit ihren Korrekturen einen beträchtlichen Teil dieser Doktorarbeit beigesteuert hat. In Gedanken ebenso meinem Opa, den ich sehr vermisse.
- meiner Mutter, die mich stets immer wieder ermunterte und mir großen Mut für die kommenden Lebensprüfungen zusprach. Und dafür, dass sie meine Mutter ist.
- Sabine für ihre grenzenlose Freundschaft und all ihre Hilfe bei vielen Kleinigkeiten, die sie mir in Laboralltagssituationen abgenommen hat.
- meiner Arbeitsgruppe für die nette Arbeitsatmosphäre und die vielen wissenschaftlichen als auch nicht wissenschaftlichen Diskussionen im Sitzkreis.
- allen Menschen, die mir sonst geholfen und beigestanden, mich per e-mail oder am Telefon unterstützt haben und immer für mich da waren. Danke!