



**Masernvirus-Infektion von Dendritischen Zellen und
Virus-Transmission an T-Zellen**

**Measles virus infection of dendritic cells and
virus transmission to T cells**

Zur Erlangung des naturwissenschaftlichen Doktorgrades
der Graduate School of Life Sciences
Julius – Maximilians – Universität Würzburg

Klasse: Infection and Immunity

vorgelegt von

Susanne Köthe

aus

Gera

Würzburg 2012

Eingereicht am:.....

Mitglieder des Promotionskomitees:

Vorsitzender : Prof. Dr. Thomas Hünig

1. Betreuer : Prof. Dr. Sibylle Schneider-Schaulies

2. Betreuer : Prof. Dr. Georg Krohne

3. Betreuer : Dr. Paul Duprex

Tag des Promotionskolloquiums:.....

Doktorurkunden ausgehändigt am:

Affidavit

I hereby confirm that my thesis entitled “Measles virus infection of dendritic cells and transmission to autologous T cells” is the result of my own work. I did not receive any help or support from commercial consultants. All sources and / or materials applied are listed and specified in the thesis.

Furthermore, I confirm that this thesis has not yet been submitted as part of another examination process neither in identical nor in similar form.

.....

Place, Date

.....

Signature

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich an Eides statt, die Dissertation „Masernvirus-Infektion von dendritischen Zellen und Virus-Transmission an autologe T-Zellen“ eigenständig, d.h. insbesondere selbstständig und ohne Hilfe eines kommerziellen Promotionsberater angefertigt und keine anderen als die von mir angegebenen Quellen verwendet zu haben.

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

.....

Ort, Datum

.....

Unterschrift

Index

1	Einleitung	1
1.1	Das Masernvirus (MV)	1
1.1.1	Taxonomie	1
1.1.2	Epidemiologie, Pathogenese und klinische Merkmale	2
1.1.3	MV-induzierte Immunsuppression	4
1.1.4	Morphologie und Genom.....	5
1.1.5	Genomorganisation, Replikation und Transkription	8
1.1.6	MV Matrix-Protein und MV-Partikelmorphogenese.....	9
1.1.7	Virus-Aufnahme und Fusion	11
1.2	Dendritische Zellen (DC)	12
1.2.1	Antigen-Präsentation	12
1.2.2	Masernvirus-Infektion von DCs	14
1.3	Virale Transmission in der Virologischen Synapse	15
1.4	Fragestellung	20
2	Material	21
2.1	Zellen	21
2.1.1	Zelllinien.....	21
2.1.2	Primäre Zellen	22
2.2	Bakterien	22
2.3	Masernviren	22
2.4	Plasmide	23
2.5	Primäre Antikörper	23
2.5.1	Modifizierte Primärantikörper	23
2.5.2	Unmodifizierte Primärantikörper.....	24
2.6	Fluoreszierende Farbstoffe	27
2.7	Zellkulturmedien und Zusätze	28
2.7.1	Eukaryontische Zellen	28
2.7.2	Bakterien.....	29
2.7.3	Kits	29
2.8	Reagenzien, Puffer und Lösungen	30
2.9	Chemikalien	33
2.10	Verbrauchsmaterialien	34
2.11	Equipment	34
2.12	Software	35

Index

3	Methoden.....	36
3.1	Zellkultur	36
3.1.1	Zellkultur adhärenter und semiadhärenter Zelllinien und Suspensionszelllinien	36
3.1.2	Bestimmung der Lebendzellzahl	36
3.1.3	Kryokonservierung & Auftauen von Zelllinien.....	37
3.1.4	Isolation von PBMCs.....	37
3.1.5	Isolierung von Monozyten, <i>in vitro</i> Differenzierung in unreife DCs (iDC) und Ausreifung von DC (mDCs).....	37
3.1.6	Aufreinigung und Aktivierung von T-Zellen	38
3.2	Virologische Methoden.....	39
3.2.1	Präparation von Virusstocks	39
3.2.2	Bestimmung der Titer mittels Endpunkttitration nach Spearman und Kärber	40
3.2.3	MV-Infektion adhärenter und semiadhärenter Zelllinien	41
3.2.4	MV-Infektion von Suspensionszellen.....	41
3.2.5	MV-Beladung (<i>trans</i> -MV-DCs) und Infektion von DCs (<i>cis</i> -MV-DCs)	42
3.2.6	MV-Transmission von <i>trans</i> -MV-DC oder <i>cis</i> -MV-DCs an T-Zellen.....	42
3.2.7	Virustitraion zur Analyse der Produktion infektiöser viraler Partikel von MV-DCs und MV-B95a Zellen.....	43
3.3	Molekularbiologische Methoden	44
3.3.1	Hitzeschock-Transformation von kompetenten Bakterien	44
3.3.2	Glycerol-Bakterienstocks	44
3.3.3	Plasmid-DNA Präparation	44
3.3.4	Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration	45
3.3.5	Agarose-Gelelektrophorese	45
3.4	Transfektion	45
3.4.1	Transfektion von HeLa-Zellen mit PEI.....	45
3.4.2	Transfektion von T-Zellen (Amaxa®).....	46
3.5	Durchflusszytometer / <i>Fluorescence-activated cell sorter</i> (FACS)	46
3.5.1	Fixierung.....	46
3.5.2	Oberflächenfärbung (FACS)	47
3.5.3	Intrazelluläre Färbung (FACS).....	47
3.6	Immunfluoreszenzmikroskopie	47
3.6.1	Aussäen der DCs auf PLL-beschichteten <i>chamber slides</i>	47
3.6.2	Bildung von autologen DC / T-Zell-Konjugaten auf <i>chamber slides</i>	48
3.6.3	Aussaat von semiadhärenten und adhärenten Zelllinien auf Deckgläsern.....	48
3.6.4	Oberflächenfärbung (IF).....	48

Index

3.6.5	Intrazelluläre Färbung (IF)	49
3.6.6	Zenon® labelling kit.....	49
3.6.7	HRP-Färbung.....	49
3.6.8	Färbung des Zellkerns	50
3.6.9	Kolokalisationsanalyse – WCIF Image J.....	50
3.6.10	Proteinlokalisationsanalyse in DC / T-Zell-Konjugaten	50
3.7	<i>Biarsenical dye – fluorescein arsenical hairpin binder (FIAsH)</i>	51
3.7.1	FIAsH & ReAsH-Markierung.....	51
3.8	Proteinbiochemie	53
3.8.1	Präparation von Zelllysaten	53
3.8.2	Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)- Assay	53
3.8.3	Fraktionierung Detergenzresistenter Membranfraktionen (DRM).....	53
3.8.4	Viruspartikel- / <i>Virus like particle</i> -Freisetzungssassay.....	54
3.8.5	SDS–Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	54
3.8.6	Western-Blot-Analyse und Quantifizierung	55
3.9	Statistische Analyse	56
4	Ergebnisse	57
4.1	MV-Infektion von DCs (MV-DCs)	57
4.1.1	Effizienz der MV-Infektion.....	57
4.1.2	DC-Ausreifung nach MV-Infektion	60
4.1.3	Partikelmorphogenese und Freisetzung infektiöser Virionen in MV-DCs.....	62
4.1.4	Akkumulation von MV-Proteinen in MV-DCs	63
4.1.5	Subzelluläre Verteilung der MV-Proteine in DCs.....	64
4.1.5.1	DRM-Assoziation des M-Proteins.....	64
4.1.5.2	Kolokalisationsanalyse der MV-Proteinen in infizierten DCs.....	65
4.1.5.3	Kolokalisation der MV-Proteine.....	66
4.1.5.4	Kolokalisation des M-Proteins mit Komponenten des sekretorischen Transportweges	67
4.1.5.5	Kolokalisation der MV-Proteine mit Markerproteinen der endosomalen und lysosomalen Transportwege	68
4.1.5.6	Kolokalisation der MV-Proteine mit Tetraspaninen.....	69
4.2	MV M-Tetracystein-Fusionsprotein	73
4.2.1	Das rekombinante MV M-TC Protein	73
4.2.2	Charakterisierung des rekombinanten M323-TC Proteins	74
4.2.3	rMV323 M-TC - Infektion von Zellen	76
4.3	Transmission des MV von DCs an autologe T-Zellen	78

Index

4.3.1	MV-Infektion von T-Zellen ist abhängig von der CD150-Oberflächenexpression.....	78
4.3.2	Effiziente MV-Transmission durch DC-vermittelte <i>cis</i> -Infektion.....	79
4.3.3	Die Abhängigkeit der MV-Transmission von MV-Glykoproteinen und CD150 auf der T-Zelle	82
4.3.4	MV-DCs bilden Polykonjugate mit stimulierten T-Zellen	84
4.3.5	Abhängigkeit der MV-Transmission von Zell-Zell-Kontakten	85
4.3.6	MV-Proteine akkumulieren in der MV-induzierten VS	85
4.3.7	CD150-Umverteilung in die VS ist aktinabhängig.....	88
4.3.8	Polarisation von ICAM-1, Integrin LFA-1, MV-Korezeptoren DC-SIGN und Substanz P Rezeptor (SPR) zur VS.....	89
4.3.9	CD81 ist ein Komponent der VS und seine Zugänglichkeit verbessert die MV-Transmission.....	91
4.3.10	Moesin und pERM akkumulieren in der VS	92
5	Diskussion	94
5.1	MV-Infektion von iDCs	94
5.2	Die Detektion von MV M-TC-Fusionsproteinen.....	101
5.3	MV-Transmission von DCs an autologe T-Zellen innerhalb der Virologischen Synapse	103
6	Zusammenfassung.....	114
7	Summary	116
8	Literaturverzeichnis.....	118
9	Abkürzungsverzeichnis.....	130
10	Veröffentlichungen.....	134
10.1	Publikationen.....	134
10.2	Vorträge	134
10.3	Poster.....	135
11	Lebenslauf.....	Fehler! Textmarke nicht definiert.

1 Einleitung

1.1 Das Masernvirus (MV)

Die akute Masernerkrankung ist eine hochansteckende Krankheit, die durch eine Infektion mit dem Masernvirus hervorgerufen und durch Tröpfcheninfektion übertragen wird. Eine infizierte Person ist in der Lage, das Virus auf 15 bis 20 Menschen zu übertragen. Die Masernerkrankung ist eine epidemische Kinderkrankheit, die im Jahr 2008 weltweit zu 164.000 Todesfällen führte (WHO, 2008). Die Krankheit wurde erstmals von dem persischen Arzt Rhazes im 10. Jahrhundert wissenschaftlich beschrieben, wo er sie von Pocken und Windpocken unterschied. Die Masernerkrankung kann durch eine Impfung mit einem attenuierten Lebendimpfstoff, die einen lebenslangen Schutz vermittelt, verhindert werden.

1.1.1 Taxonomie

Das Masernvirus (MV) gehört zur Familie der *Paramyxoviridae*, die in die Gruppe *Mono-negavirales* eingeordnet wird. Diese Familie ist gekennzeichnet durch ein nicht-segmentiertes, einzelsträngiges RNA-Genom von negativer Polarität. Die Anordnung der Gene innerhalb des RNA-Genoms ist in dieser Familie hochkonserviert. Sechs Genera gehören zur Unterfamilie *Paramyxovirinae*. MV gehört zum Genus *Morbillivirus* (Tabelle 1-1). Mitglieder dieses Genus sind gekennzeichnet durch die Abwesenheit der Neuraminidase-Aktivität und verursachen ähnliche Erkrankungen in ihren Wirten. MV ist innerhalb des Genus *Morbillivirus* das einzige Humanpathogen. Allerdings können experimentell auch einige Primatenarten mit Masernviren infiziert werden. MV ist evolutionsgeschichtlich ein relativ junges Virus, das vermutlich vor 4.000 bis 5.000 Jahren aus dem Rinderpest-Virus hervorgegangen ist. Die Masern werden daher als eine Zivilisationskrankheit angesehen. Die weltweit vorkommenden und zirkulierenden bzw. ausgestorbenen verschiedenen MV-Genotypen, die in 8 Gruppen (A-H) unterteilt sind, werden aufgrund der C-terminalen Sequenz des Nukleokapsid-Proteins (N) unterschieden.

Einleitung

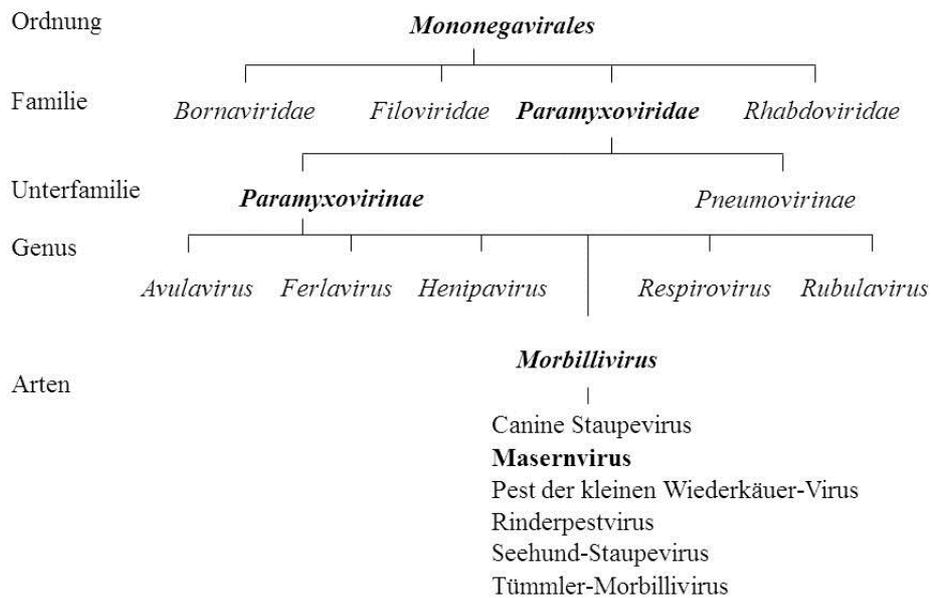


Tabelle 1-1: Taxonomische Gliederung der Ordnung *Mononegvirales* (Diese Abbildung wurde der Doktorarbeit von Christine Lehmann, 2006, entnommen und modifiziert).

1.1.2 Epidemiologie, Pathogenese und klinische Merkmale

Die Masernerkrankung ist eine akute virale Infektionskrankheit. Jährlich sind weltweit mehr als 20 Millionen Menschen durch Masernerkrankungen betroffen (WHO). Im Jahr 2008 starben etwa 164.000 Menschen an den Folgen einer Masernvirus-Infektion. Die Krankheit ist die häufigste Todesursache für Kinder in einkommensschwachen Ländern. Durch eine verstärkte Umsetzung von Impfkampagnen konnte die durch Maserninfektion hervorgerufene Mortalität in den Jahren von 2000 bis 2008 um 78 % reduziert werden. Die mit den akuten Masern assoziierten Mortalitätsraten sind nahezu ausschließlich der durch die Infektion induzierten transienten Immunsuppression zuzuschreiben. Diese führt zu einer erhöhten Suszeptibilität für sekundäre Infektionen und zu Reaktivierungen persistierender Infektionen.

Die Masernerkrankung ist eine systemische Infektion. Das hochinfektiöse MV wird durch Tröpfchen über kurze Distanzen übertragen. Das Epithel des Respirationstraktes ist der primäre Infektionsort. Gewebsspezifische Antigen-präsentierende Zellen (APC) wie Dendritische Zellen (DC) und Makrophagen sind möglicherweise die ersten Zellen, die CD150-abhängig infiziert werden [1]. Im Tiermodell konnten zwei Tage nach Infektion ausschließlich im alve-

Einleitung

olaren Lumen sowie in dem alveolaren Epithelium umgebend infizierte Zellen nachgewiesen werden, die phänotypisch mononukleären Zellen entsprachen. Von der Lunge breitete sich die Infektion zu dem Bronchien-assoziierten Lymphgewebe (*bronchus-associated lymphoid tissue (BALT)*) und zu den Trachea-bronchialen Lymphknoten aus. Vier Tage nach Infektion konnten MV-infizierte Zellen sowohl im peripheren Blut als auch in verschiedene lymphatischen Geweben gefunden werden [2]. Für die MV-Dissemination spielen demnach Antigen-spezifische Zellen wie DCs und Makrophagen eine Schlüsselrolle, die den Transport aus dem Respirationstrakt zu den lokalen Lymphknoten vermitteln. Dort kommt es zu einer verstärkten Replikation und Virusvermehrung sowie zu Gewebszerstörungen. In der folgenden primären Virämie breitet sich das Virus systemisch über den Blutkreislauf zunächst innerhalb des retikolendothelialen Systems und anschließend, in einer sekundären Virämie, in die Zielorgane und äußere Hautschichten aus. Der Krankheitsverlauf der Masernerkrankung erfolgt in zwei Phasen. Der Inkubationszeit von 10 Tagen folgt das Prodromalstadium, das durch Auftreten von Fieber, der Entzündung der Schleimhäute des oberen und mittleren Atemtraktes (Rhinitis) sowie der Entzündung der Augenbindehäute (Konjunktivitis) charakterisiert ist. 1-2 Tage vor dem Einsetzen des Exanthemstadiums erscheinen Kopliksche Flecken auf der Mundschleimhaut. Das Exanthemstadium charakterisiert die 2. Phase der Masernerkrankung und tritt etwa 14 Tage nach Infektion ein. Hinter den Ohren und an der Haarlinie beginnend, breitet sich das maserntypische Exanthem schrittweise über das Gesicht in die Extremitäten aus. 14-16 Tage nach der Maserninfektion steigen die Titer Masern-spezifischer Antikörper an, parallel sinkt die Viruslast im peripheren Blut. Allerdings dauert es einige Monate, bis die virale genomische RNA nicht mehr im Körper nachgewiesen werden kann [3]. In immunkompetenten Infizierten treten Komplikationen während der akuten Masernerkrankung eher selten auf.

Allerdings sind gefährliche Komplikationen im Zentralnervensystem bekannt. Dies sind die akute postinfektiöse Masern-Enzephalitis (*acute post-infection measles encephalitis, APME*), die Einschlusskörperchen-Enzephalitis (*measles inclusion body encephalitis, MIBE*) und die subakute sklerosierende Panenzephalitis (*subacute sclerosing panencephalitis, SSPE*). Die APME entsteht kurz nach dem Auftreten des Exanthems mit einer Frequenz von einem in 1.000-5.000 Krankheitsfällen. Die Symptome sind wiederkehrendes Fieber, Kopfschmerzen, Schlaganfälle, zerebellare Ataxien und Koma. In Gehirngewebeproben oder im Liquor von Patienten können weder MV noch Masern-spezifische Antikörper nachgewiesen werden, wohl aber autoreaktive T-Zellen. Daher wird eine virusinduzierte Auto-Immunpathologie als kausal angenommen. MIBE und SSPE werden durch eine persistierende Maserninfektion des

Einleitung

Gehirngewebes hervorgerufen [4]. Die MIBE erfolgt typischerweise zwei bis sechs Monate nach dem Auftreten einer akuten Masernerkrankung bei immunsupprimierten Patienten [5]. Im Gegensatz zur MIBE manifestiert sich die SSPE generell in immunkompetenten Kindern und Jugendlichen sechs bis acht Jahre nach der Virusinfektion mit einer Häufigkeit von einem in 10.000-25.000 Fällen. Die SSPE ist eine seltene, langsam und tödlich verlaufende Degeneration des Zentralnervensystems. Die persistierende Infektion des Gehirns ist durch hohe Titer MV-spezifischer Antikörper in Serum und Liquor gekennzeichnet.

Sequenzanalysen des viralen Genoms bei SSPE- und MIBE-Patienten zeigten eine relativ hohe Frequenz von Mutationen in den Hüllproteinen [5]. Beispielweise führt eine Mutation im Gen des Hämagglutinin (H)-Proteins zu einem verminderten Transport des H-Proteins zur Zelloberfläche [6]. Besonders häufig finden sich zudem Mutationen in der zytoplasmatischen Domäne des Fusionsproteins sowie Mutationen, die das Leseraster des Matrix (M)-Proteingens betreffen [5, 7, 8]

1.1.3 MV-induzierte Immunsuppression

Der Induktion einer lebenslangen virusspezifischen Immunität steht eine ausgeprägte und unspezifische Immunsuppression gegenüber. Die induzierte Immunsuppression ist gekennzeichnet durch eine Lymphopenie [9], eine sehr frühe und anhaltende T_H2 -Antwort [10] sowie eine fehlende Proliferation peripherer Blutlymphozyten (PBL) in Antwort auf Mitogene oder Allogene *ex vivo* [11].

Die Lymphopenie wird über eine reduzierte Anzahl von T- und B-Zellen definiert, die während des Exanthemstadiums auftritt. Die Ligandierung des MV-Eintrittsrezeptors CD150 begünstigt eine CD95-vermittelte Apoptose von ruhenden Lymphozyten durch MV-infizierte Zellen [12, 13]. Eine kürzlich erschienene Publikation zeigte, dass MV-infizierte Lymphozyten Zugang zum Knochenmark haben, dem Ort der Lymphopoese, und auf diesem Weg möglicherweise zusätzlich zu der beschriebenen Lymphopenie der PBLs beitragen [14]. Die MV-Infektion modifiziert die Art der Immunantwort, die durch die Induktion von regulatorischen T-Zellen sowie eines Ungleichgewichts hin zu Typ-2-T-Helferzellen (T_H2) charakterisiert ist [12, 15]. Das T_H2 -Zytokinprofil ist gekennzeichnet durch eine Suppression der Produktion von IL-12, durch aktivierte Makrophagen und infizierte DCs *in vitro* [16-18] sowie durch einen erhöhten Spiegel von IL-4, IL-10 und IL-13 *in vivo*, der bis zum Verschwinden des Exanthem erhalten bleibt [12]. Es wird angenommen, dass die T_H2 -Dominanz die zelluläre Immunität, im Be-

Einleitung

sonderen die T-Zell-Effektorfunktion, beeinträchtigt und damit zur Immunsuppression *in vivo* beiträgt. Die MV-Infektion von Lymphozyten *in vitro* inhibiert den Ablauf des Zellzyklus und induziert einen Arrest in der G1-Phase [19]. In Folge dessen ist die Proliferation der Lymphozyten vermindert [16]. *In vivo* liegt MV fast nie zellfrei vor, daher muss MV durch infizierte Zellen, im Speziellen von DCs, auf T-Zellen übertragen werden [20]. Für die zellassoziierte Infektion sind Kontakte zwischen diesen Zellen essentiell. Ein vielfach beschriebener Kontakt ist die Immunologische Synapse (IS). MV-infizierte DCs (MV-DCs) formen vorwiegend instabile IS, die die beobachtete Unfähigkeit von infizierten DCs, allogene T-Zell-Expansion in *mixed lymphocyte reactions* (MLR) zu stimulieren, erklären könnten [20, 21]. Ob die IS auch als Transmissionsstruktur fungiert, ist nicht bekannt. Die Hemmung der T-Zell-Expansion wird durch deren Kontakt mit den MV-Glykoproteinen H und F, entweder auf MV-Virionen oder transfizierten Zellen, die die Glykoproteine F und H auf der Oberfläche koexprimieren, vermittelt. Hierdurch wird die Aktivierung der PI3/Akt-Kinase nach IL2-R- oder α CD3/28-Ligation in T-Zellen blockiert [22]. Zu den nachgeschalteten Effektoren der PI3/Akt-Kinase gehört die Untereinheit der Cyclin-abhängigen Kinase, die in den Übergang von der G1- in die S-Phase während des Zellzyklus involviert ist [23]. Die PI3-Kinase kontrolliert zusätzlich die Dynamik des Aktin-Zytoskeletts, das für die Migration von T-Zellen, für die Formation von Kontaktflächen mit DCs sowie für Akkumulation und Sortierung von Rezeptoren an der Kontaktfläche verantwortlich ist. Es konnte experimentell gezeigt werden, dass die MV-Interaktion mit T-Zellen zu einem Verlust von Aktin-basierten Ausstülpungen führt [24]. Passend dazu wurde eine Publikation veröffentlicht, in der nachgewiesen wurde, dass der Kontakt des MV mit T-Zellen Ceramide induziert, die die Formation von Membranausstülpungen verhindern sowie die Bewegung von T-Zellen durch den Verlust der Polarisierung beeinträchtigen [25].

1.1.4 Morphologie und Genom

MV-Partikel sind sehr pleomorph und haben eine durchschnittliche Größe von 120-250 nm. Die Virionen sind umhüllt und umschließen den Ribonukleoprotein (RNP)-Komplex, der das unsegmentierte, einzelsträngige RNA-Genom von negativer Polarität enthält. 6 Strukturproteine sind für den Zusammenbau des infektiösen Partikels notwendig. Die Hülle besteht aus Membranlipiden, die aus dem Zytoplasma der Wirtszelle stammen und enthält die beiden Glykoproteine, das Hämagglutinin (H)-Protein und das Fusions (F)-Protein, die oligomere

Einleitung

spikes formen und Liganden für den MV-Anheftungsrezeptor DC-SIGN sind [26]. Das H-Protein bindet an den zellulären MV-Eintrittsrezeptor für wildtypische und attenuierte MVs, CD150 / SLAM (*signalling lymphocyte activation molecule*) [27]. Durch entstandene Mutationen im H-Protein können attenuierte MV-Stämme zusätzlich CD46 [28-30], auch *membrane cofactor protein* (MCP) genannt, benutzen, das zu den Komplementregulatoren gehört und auf allen kernhaltigen Zellen exprimiert wird. Erst kürzlich wurde Nectin-4 als MV-Rezeptor auf Epithelzellen beschrieben, der von Wildtyp- wie auch von Vakzinestämmen genutzt wird [31, 32].

Das F-Protein vermittelt den Zell-Eintritt durch koordinierte Fusion der Virionenmembran mit der Zielzellmembran [33]. Das F-Vorläuferprotein (F₀) ist inaktiv und wird mittels proteolytischer Spaltung durch eine zelluläre Furin-ähnliche Protease im *trans*-Golgi-Kompartiment biologisch aktiv. Die beiden daraus resultierenden Untereinheiten F₁ und F₂ sind über Disulfidbrücken miteinander verbunden. Die zytoplasmatischen Enden des F- und H-Proteins interagieren physisch und funktionell mit dem hydrophoben Matrix (M)-Protein [34-36], das an das Nukleokapsid (N)-Protein bindet und damit die Virionenhülle mit dem RNP verbindet [37]. Das M-Protein ist multifunktionell, weil es nicht nur in den Prozessen des Viruszusammenbaus (*assembly*), der Knospung des Virions von der Plasmamembran (*budding*) und der daraus resultierenden Freisetzung des Virions (*release*) involviert ist, sondern auch die Transkription reguliert [38]. Das N-Protein ist die Hauptkomponente des RNP-Komplexes, der zusätzlich aus dem Phospho (P)- und *Large* (L)-Protein aufgebaut ist [39]. Das L-Protein ist die katalytische Untereinheit der RNA-abhängigen RNA-Polymerase (RdRp), die sowohl als Transkriptase wie auch als Replikase arbeitet. Außerdem ist das L-Protein für die Polyadenylierung [40], das *capping* und das Editieren der viralen Transkripte verantwortlich [41]. Die Inkorporation des L-Proteins in das neugebildete Virus ist entscheidend für seine Infektiosität. Das P-Protein ist die kleine Untereinheit der RNA-abhängigen Polymerase, das als Transaktivator die Funktion des L-Proteins reguliert [42].

Die beiden Nichtstruktur-Proteine C und V sind unwichtig für die Virusvermehrung *in vitro*. Allerdings sind sie pathogenetisch relevant, weil sie die angeborene Immunität regulieren. Das C-Protein inhibiert die virale RNA Synthese [43, 44] und zusammen mit dem V-Protein kontrollieren sie die Produktion des Typ-I-Interferons (IFN) [45, 46] während der Maserninfektion. Dabei bindet das V-Protein an p65 (RelA) und unterdrückt damit die Aktivität von NF-κB [47]. Der Transkriptionsfaktor NF-κB kontrolliert die Transkription einer Vielzahl von entzündungsfördernden Zytokinen, deren Expression durch *Toll-like* Rezeptoren (TLR) oder

Einleitung

dem Retinolsäure-induzierbaren Gen 1-Rezeptor (*retinoic acid-inducible gene 1-receptor*, (RIG-I) induziert werden [48]. Zusätzlich unterdrückt das V-Protein den IFN-Signalweg durch Inhibition der IFN-induzierten Zellkern-Translokation von STAT1 [49] und durch Inhibition der Phosphorylierung von STAT1 und STAT2 [50].

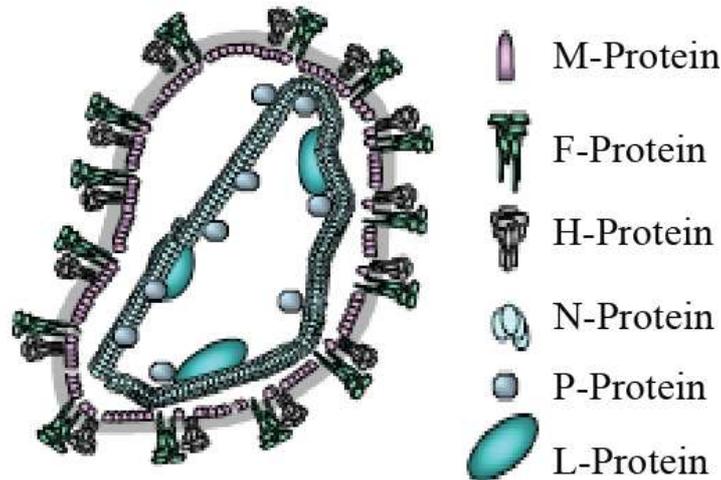


Abb. 1-1: Schematische Darstellung des MV-Partikels

Protein	Molekulare Masse	Eigenschaften
F ₀ - Protein F ₁ / F ₂ - Protein (Fusion)	60 kDa 40 / 22 kDa	Membranfusion Bildung von Trimeren Typ-I Transmembranprotein In der Virionhülle ist es mit dem H-Protein in einem Komplex assoziiert
H- Protein (Hämagglutinin)	78 kDa	Rezeptorbindung Bildung von Tetrameren Typ-II Transmembranprotein In der Virionhülle ist es mit dem H-Protein in einem Komplex assoziiert
M-Protein (Matrix)	37 kDa	Morphogenese viraler Partikel Interaktion mit den Glykoproteinen und dem Nukleokapsidprotein Regulation von Transkription und Fusion
N-Protein (Nukleokapsid)	60 kDa	Interaktion mit dem RNA-Genom
P-Protein (Phospho)	72 kDa	Ist phosphoryliert Regulation der Aktivität des L-Proteins Kleine Untereinheit der RNA-abhängigen RNA Polymerase

Einleitung

L-Protein (<i>Large</i>)	220 kDa	Transkription Katalytische Untereinheit der RNA-abhängigen RNA Polymerase
C-Protein (Nichtstruktur- protein)	28 kDa	Inhibition des Typ-I-IFN Signalweges Regulierung der viralen RNA-Synthese Steigerung der Partikelmorphogenese Translation von der P mRNA
V-Protein (Nichtstruktur- protein)	45 kDa	Suppression der NF- κ B Aktivität Inhibition des Typ-I-IFN Signalweges Synthese durch Editierung der P mRNA

Tabelle 1-2: Überblick über die MV-Proteine und ihre Eigenschaften

1.1.5 Genomorganisation, Replikation und Transkription

Das MV-RNA Genom ist nicht segmentiert, 15.894 Nukleotide lang, einzelsträngig, von negativer Polarität und vollkommen von N-Proteinen umhüllt. Die sechs Transkriptionseinheiten (Gene) sind linear in der Reihenfolge 3'-N-P/C/V-M-F-H-L-5' angeordnet und durch intergenische Sequenzen (IGS) voneinander separiert [51]. Diese IGS bestehen aus AU-reichen Gen-Endsequenzen (GE), auf die Gen-Startsequenzen (GS) folgen. Die zwei zusätzlichen Nichtstrukturproteine sind innerhalb des P-Gens kodiert. Das C-Protein wird durch einen überlappenden Leserahmen kodiert. Das V-Protein entsteht infolge des Editierens innerhalb des P-Gens, wobei die RdRp eine oder mehrere nichtkodierte G-Basen einfügt [52, 53].

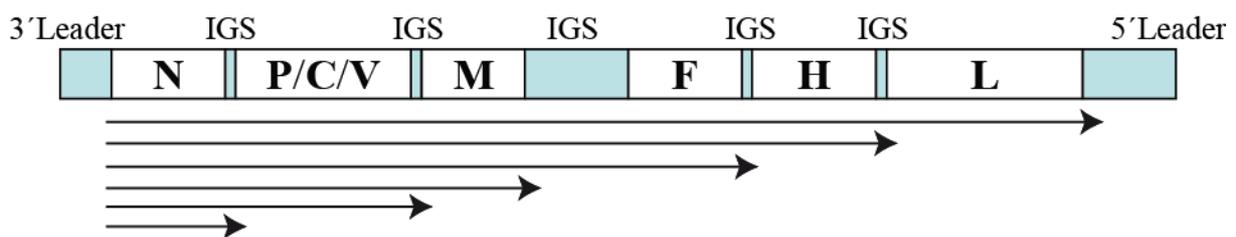


Abb. 1-2: Schematische Darstellung der Organisation des MV-Genoms und des polaren mRNA-Gradienten

Nach dem Viruseintritt wird das MV-RNA Genom in das Zytoplasma entlassen. Die RdRp fungiert als Transkriptase und als Replikase. Vier Phasen der MV-RNA Dynamik sind bekannt. Die erste Phase (Transkriptionsbeginn) startet 6 h nach Infektion (p.I.) mit der Bindung des RdRp an das 3' Ende (*leader*) des Genoms. Bei Erreichen einer GE-Sequenz überspringt die RdRp die GE-Sequenz und initiiert die Transkription des nachfolgenden Gens oder fällt

Einleitung

vom Genom ab und startet erneut mit der Transkription am 3' Ende. Als Resultat entsteht ein polarer Gradient viraler mRNA vom 3' zum 5' Ende, so dass Transkripte von Promotor-entfernten Genen weniger häufig vorkommen als von Promotor-nahen. Die zweite Phase (6-12 h p.I.) ist gekennzeichnet durch die *de novo*-Synthese von P- und L-Proteinen und der darauf folgenden Neubildung von RdRp-Komplexen, die zu einem exponentiellen Anstieg der RNA-Synthese führen. Während der MV-Infektion sind Transkription und Replikation intrinsisch miteinander verbunden. Die dritte Phase (12-24 h p.I.) ist charakterisiert durch den Wechsel hin zur Replikation, der vermutlich durch die Akkumulation ausreichender Mengen an N-Protein beeinflusst wird. Als Voraussetzung für die Initiation wird ein intermediärer RNA-Strang mit positiver Polarität benötigt. Um vollständige und umhüllte RNA-Genome positiver und negativer Polarität zu synthetisieren, ignoriert die Replikase RdRp GE, IGS, GS und editierende Sequenzen. Nach 24-28 h p.I. verlangsamt sich die RNA-Synthese deutlich und nach 28 h p.I. wird die Produktion viraler RNA vollständig gestoppt [51, 54].

1.1.6 MV Matrix-Protein und MV-Partikelmorphogenese

Die Entstehung infektiöser MV Partikel ist die letzte Stufe der Virusinfektion. Für diesen Prozess ist das M-Protein von besonderer Bedeutung. Das M-Protein ist ein basisches Protein, das aus 335 Aminosäuren besteht (37 kDa) und dessen Sequenz hoch konserviert ist [55]. Eine Substitution an der Aminosäuren-Position 89 trägt zur Adaption des Viruswachstums in verschiedenen Zellen bei, z.B. Vero-Zellen und primäre Lungenzellen von Baumwollratten [56, 57].

Das M-Protein ist ein negativer Regulator der viralen Transkription, wenn es mit dem RNP komplexiert [58]. Tatsächlich führt die Herunterregulierung der Expression des M-Proteins durch siRNA zu einer Erhöhung viraler mRNA und genomischer RNA um den Faktor 2-2.5 [38]. Die Fähigkeit des M-Proteins, zu höhermolekularen Komplexen zu oligomerisieren [59], ist wahrscheinlich zum einen für den Transport des M-Proteins zur Plasmamembran, den Zusammenbau und die Abschnürung infektiöser viraler Partikel, zum anderen für die Bildung von nichtinfektiösen virus-ähnlichen Partikeln (*virus-like-particles*, VLP) von wichtiger Bedeutung. Das M-Protein ist ein peripheres Membranprotein, das eine Schicht bildet, die die innere Seite der Virionen auskleidet. Es bindet an den zytoplasmatischen Teil der Glykoproteine F und H [34-36] und interagiert mit dem N-Protein [37] um den RNP Komplex zur Plasmamembran zu rekrutieren [60]. *In vitro* verbreitet sich das MV entweder durch die Pro-

Einleitung

duktion von neuen Partikeln oder durch Fusion einer MV-infizierten und einer benachbarten nicht infizierten Zelle, jedoch *in vivo* fast nur zellassoziiert. Die durch die Glykoproteine H und F vermittelte Zell-Zell-Fusion ist durch M-Protein-Assoziationen modulierbar. Die Stärke der Interaktion korreliert reziprok mit der Effizienz von Zell-Zell-Fusionen und positiv mit der Freisetzung von Virionen [34, 61, 62].

Die Membranassoziation des M-Proteins ist mechanistisch nicht verstanden. Sie ist, wie auch der intrazelluläre Transport, unabhängig von den Glykoproteinen. Dennoch ist der Transport des M-Proteins zur Plasmamembran abhängig von Komponenten, die nur in infizierten Zellen zur Verfügung stehen [63]. 20 % des *de novo* synthetisierten M-Proteins liegt assoziiert mit Detergenzresistenten Membranen (DRM) vor [64]. DRM-Mikrodomänen oder auch Lipid Rafts genannt, unterscheiden sich von der umgebenden Plasmamembran durch ihre Lipidkomposition, denn sie sind reich an Sphingolipiden und Cholesterol.

Die Glykoproteine F und H homo- und hetero-oligomerisieren im Endoplasmatischen Retikulum (ER). Diese vorgefertigten Komplexe werden über den sekretorischen Transportweg zur Plasmamembran befördert [65]. F-Proteine binden an DRMs, wohin infolge ihrer Assoziation mit F-Proteinen auch H-Proteine rekrutiert werden [66]. Der RNP-Komplex entsteht im Zytosol. Die Akkumulation von M-Proteinen an intrazellulären Membranen ist die Voraussetzung für einen Kotransport des RNP-Komplexes zu der Plasmamembran unabhängig von den Hüllproteinen [37]. Im Gegensatz zu HIV-1, das ebenfalls durch Abschnürung virale Partikel produziert, erfolgt der Transport von MV-Proteinen zur Plasmamembran unabhängig vom endosomalen Sortierungskomplex (*endosomal sorting complex required for transport*, ESCRT) [67, 68].

Membranständige Rafts von MV-infizierten BJAB-Zellen enthalten 30-50 % virale Proteine. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass diese Raft-Fraktionen infektiöses virales Material enthielten, das sich von reifen viralen Partikeln unterschied [64]. Der Zusammenbau der Virionen könnte daher in den Lipid Rafts vorkommen. Die Abschnürung andererseits findet wahrscheinlich außerhalb der Lipid Rafts statt, weil reife Virionen auch nicht-Raft-Membranen enthalten. Im Vergleich zu anderen Viren ist die MV-Partikel-Abgabe in den Überstand ineffizient und Virionen weisen eine hohe Zell-Assoziation auf.

1.1.7 Virus-Aufnahme und Fusion

Der MV-Eintritt in die Zielzelle erfolgt über die Bindung an zelluläre Rezeptoren. Der Eintrittsrezeptor des Wildtyp-Stamm ist CD150 / SLAM (*signaling lymphocyte activation molecule*) [27, 69]. CD150 wird von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert und ist ein Glykoprotein, das zur Superfamilie der Immunglobuline (Ig) gehört. Es ist der MV-Eintrittsrezeptor auf hämatopoetischen Zellen und besteht aus einer N-terminalen Signalsequenz, zwei Ig-ähnlichen Domänen, einer Transmembrandomäne sowie einem zytoplasmatischen Teil. CD150 wird auf der Oberfläche aktivierter B- und T-Zellen, reifer DCs und Makrophagen exprimiert. Die Expression von CD150 wird durch Stimulation von TLR2 und TLR4 [70], IL-1 β [71] und CD40L [72] erhöht.

CD150 vermittelt verschiedene Funktionen: 1) durch homotypische Interaktionen (Selbstligand) - als kosignalisierender Rezeptor involviert in T-Zell-Aktivierung und in der Entwicklung natürlicher Killer-T-Zellen (*natural killer T cells*, NKT cells) und 2) durch heterotypische Interaktionen – als mikrobiologischer Sensor für gram-negative Bakterien und Eintrittsrezeptor für MV [73].

MV infizieren Zielzellen durch Fusion der Virushülle mit der Plasmamembran der Zelle bei neutralem pH. Das H-Protein hat ein zytoplasmatisches Ende am N-Terminus, eine Transmembranregion, einen Stamm und eine rezeptorbindende C-terminale globuläre Kopfdomäne. Der Kopf besteht aus 6 Blätter, die wie β -Propeller gefaltet sind [74]. Das gegenwärtige MV-Fusionsmodell schlägt folgenden Mechanismus vor: Nach Bindung des zellulären Rezeptors durch das H-Protein dissoziiert der heterooligomere MV-Glykoprotein-Präfusionskomplex, in welchem die Kopfdomäne des F-Proteins in Kontakt mit dem Stamm des H-Proteins steht und so das Präfusionsprotein stabilisiert [75]. Die Dissoziation induziert Konformationsänderungen, die zu einem metastabilen Fusionsprotein führen. Das hypothetische Haarnadel (*hairpin*)-Intermediat bringt sowohl die Zellmembran als auch die Virusmembran in räumliche Nähe zueinander und vermittelt dadurch die Membranfusion. Durch die Faltung des F-Proteins in die Postfusionskonformation entstehen Fusionsporen, die so den MV-Eintritt in die Zelle ermöglichen [33, 76, 77].

1.2 Dendritische Zellen (DC)

DCs sind professionelle Antigen-präsentierende Zellen (*antigen-presenting cells*, APC). Ihre Hauptfunktion ist die Aufnahme immunogenen Materials, dessen Prozessierung und Präsentation. Dabei verbinden DCs das angeborene mit dem erworbenen Immunsystem. DCs sind morphologisch charakterisiert durch die Ausbildung langer zytoplasmatischer Fortsätze, die Dendriten. Des Weiteren gibt es verschiedene Formen von DCs, die verschiedene Funktionen ausführen, u.a. myeloide konventionelle und plasmazytoide DCs (pDCs). pDCs sind frühe Effektorzellen des angeborenen Immunsystems. Einmal aktiviert, produzieren und sekretieren pDCs große Mengen von Typ-I-IFN [78], jedoch präsentieren sie nur schlecht Antigene im Vergleich zu konventionellen DCs. Diese produzieren überwiegend entzündungsfördernde Zytokine, wie IL-12, TNF α , IL-6 und IL-1 α/β , und aktivieren so die T-Zell-Effektorfunktionen. Im folgenden Abschnitt werden die konventionellen DCs im Fokus stehen.

1.2.1 Antigen-Präsentation

Unreife DCs (*immature DCs*, iDCs) sind in peripheren Geweben lokalisiert. Auf Grund ihrer hohen endozytotischen Fähigkeiten nehmen sie kontinuierlich lokale Antigene aus ihrer Umgebung auf, prozessieren sie und präsentieren sie in Assoziation mit dem Haupthistokompatibilitätskomplex (*major histocompatibility complexes*, MHC) auf ihrer Zelloberfläche. Das MHC-Oberflächen-Expressionsniveau von iDCs ist aufgrund der kurzen Halbwertszeit der Moleküle niedrig. Kostimulatorische Moleküle, wie z.B. CD40, CD80 und CD86, sind auf iDCs ebenfalls nur wenig exprimiert [79]. Im Gegensatz dazu sind mustererkennende Rezeptoren (*pattern recognition receptors*, PRR) [80], wie z.B. TLRs [81], C-Typ Lektin-Rezeptoren (*C-type lectin receptors*), wie DC-SIGN (*DC-specific intercellular adhesion molecule (ICAM3) grabbing non-integrin*, CD209) [82] oder DEC-205 (CD205) [83], die pathogen-assoziierte Motive detektieren, hoch exprimiert und leiten nach deren Erkennung die DC-Aktivierung ein, die von einer lokalen Zytokinproduktion begleitet wird. Zusätzlich exprimieren iDCs Fc α (CD32)- und Fc ϵ (CD23)-Rezeptoren, die antikörpergebundene Bakterien oder Viren binden (Opsonisierung) und so ebenfalls die Ausreifung von DCs induzieren [84]. Die DC-Reifung korreliert mit einer Verminderung der Antigenaufnahme, einer Ver-

Einleitung

stärkung der Oberflächenexpression von MHC-Peptid-Komplexen durch eine verlängerte Halbwertszeit sowie der Hochregulierung kostimulatorischer Moleküle, wie CD40, CD80, CD86, und T-Zell-Adhäsionsmoleküle, wie LFA-1 und β 1-Integrine. Zusätzlich wird die Expression der Fc-Rezeptoren herunterreguliert, das Expressionsmuster von Chemokinrezeptoren ändert sich und die Migration zu den peripheren Lymphorganen wird initiiert, um T-Zellen Antigene zu präsentieren [85]. Um die herausragende Effizienz der Antigenprozessierung und -präsentation gewährleisten zu können, haben DCs spezialisierte Endozytose- und intrazelluläre Sortierungswege. Endosomen dienen zum Beispiel der Sortierung beladener Membranproteine, die entweder zum Golgi-Apparat und über den sekretorischen Transportweg zur Oberfläche re-transportiert werden oder zu späten Endosomen / multivesikulären Körperchen (*multivesicular bodies*, MVB) reifen, die nachfolgend Cargo in lysosomale Kompartimente zur Degradation leiten können. MVBs kommen in großer Zahl in unreifen DCs (*immature DC*, iDC) vor und bestehen aus einer begrenzenden Membran, die viele intraluminale Vesikel (*intraluminal vesicles*, ILV) umschließt. Die Mehrheit der MHC II-Moleküle (75%) akkumulieren im endosomalen Lumen der MVBs [86]. Die Moleküle sind hier mit Peptiden für die Oberflächenpräsentation beladen [87] oder aber infolge einer Ubiquitylierung in ILVs sortiert, aus denen sie in den degradativen Weg geleitet werden [88]. Während der Ausreifung wird ein neuer Pool MHC II-Moleküle synthetisiert, der zu endosomal- und lysosomal-begrenzenden Membranen transportiert und dort mit Peptiden beladen wird. Diese Komplexe werden von den begrenzenden Membranen über Membranröhren und Vesikel zur Plasmamembran transportiert [89]. Im Zuge der Ausreifung kommt es zu einer Akkumulation ungenau translatierter und falsch gefalteter Proteine, die defekte ribosomale Produkte (*defective ribosomal products*, DRiPs) genannt werden und in großen transienten polyubiquitylierten Proteinaggregaten akkumulieren, die sogenannten *DC aggresome-like induced structures* (DALIS). Es wird angenommen, dass DRiPs als Hauptquelle für MHC I-präsentierte Selbst-Antigene, aber auch für virale Antigene dienen [90, 91]. Die Kreuzpräsentation (*cross-presentation*) ermöglicht es DCs, ihr Repertoire von Peptiden, die auf MHC I-Moleküle geladen werden können, zu vergrößern. Der Begriff beschreibt die Fähigkeit von DCs exogene Antigene zu prozessieren und anstatt auf MHC II, auf MHC I-Moleküle zu präsentieren, die folglich von CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden. Auf diesem Weg können Immunantworten gegen Tumore oder Viren initiiert werden, die die DCs nicht infiziert haben [92].

1.2.2 Masernvirus-Infektion von DCs

Gewebsresidente CD150⁺ DCs und Makrophagen im Respirationstrakt sind die ersten MV-Zielzellen [1, 20]. Dies ist möglich, da intraepitheliale DCs (IEDCs) die Fähigkeit besitzen, lange Dendriten zu bilden, die durch *tight junctions* hindurch bis in das Lumen der Luftröhre reichen, um luminale Antigene zu sammeln [93]. Für die experimentiellen Untersuchungen der Interaktion von MV mit DCs wurden Monozyten verwendet, die in Kultur durch Zugabe von Interleukin-4 (IL-4) und GM-CSF (*Granulocyte macrophage colony-stimulating factor*) zu DCs generiert wurden.

Diese unreifen DCs exprimieren nur geringe Mengen des MV-Eintrittsrezeptor CD150 auf der Oberfläche, aber hohe Mengen von DC-SIGN, welches MV-Bindung, aber nicht den Eintritt des Virus in die Zelle vermittelt [26]. Nach Ausreifung der DCs durch LPS, CD40L- oder TNF α wird CD150 auf der Zelloberfläche herauf- [26, 71, 72] und DC-SIGN herunterreguliert [26]. Die MV-Infektion von iDCs (MV-DC) induziert die Freisetzung von Typ-I-IFN, die zur phänotypischen Ausreifung der DCs beiträgt und durch die Hochregulierung der Oberflächenexpression von Reifungs- und Aktivierungsmarkern, wie z.B. MHC II, CD40, CD80, CD83, CD86 und CD25, charakterisiert ist [94, 95]. Im Rahmen der MV-Infektion verändern sich zusätzlich die Morphologie und die Adhärenz der MV-DCs, Eigenschaften, die denen LPS-ausgereifter DCs (mDC) gleichen. Die Zellen weisen einen polarisierten und migratorischen Phänotyp auf und bilden aktinhaltige Membranausstülpungen aus [21]. Im Gegensatz zu einer effizienten Akkumulation viraler Proteine in MV-DCs, ist die Produktion von Virionen in infizierten iDCs gering und in infizierten LPS-mDCs kaum nachweisbar. Jedoch repliziert MV intensiv in CD40-aktivierten DCs [18, 95]. Obwohl *in vitro* gezeigt werden konnte, dass MV-DCs nur unzureichend die Chemokinrezeptoren auf der Zelloberfläche wechseln, um initial auf proinflammatorische und später auf lymphoidartige Chemokine antworten zu können [96], welche die Voraussetzung für die Migration aktivierter DCs zu sekundären lymphatischen Organen sind, konnte eine große Anzahl an DCs in Konjugaten mit infizierten T-Lymphozyten in peripheren Geweben von MV-infizierten Makaken gefunden werden, wo MV-Transmissionsvorgänge zu vermuten sind [1].

1.3 Virale Transmission in der Virologischen Synapse

Die Virologische Synapse (VS) ist eine enge adhäsive Verbindung zwischen einer Virus-infizierten und einer nicht-infizierten Zelle, die den Virustransfer von Zelle zu Zelle in der Abwesenheit von Zell-Zell-Fusionen ermöglicht. Die Ausbildung der VS und die Transmission über die VS ermöglicht die Abschirmung vom Immunsystem und eine im Vergleich zur zellfreien Infektion um Potenzen erhöhte Transmissionseffizienz [97]. Die VS erinnert in ihrer Morphologie an die Immunologische Synapse (IS). Im Gegensatz zu MV-VS wurde die HIV-VS, die zwischen einer HIV-1 infizierten DC bzw. T-Zelle und einer konjugierten uninfizierten T-Zelle entsteht, vielfach analysiert. T-Lymphozyten sind hoch migratorische Zellen. Um eine VS / IS ausbilden zu können, müssen T-Zellen zuerst arretieren. Für die IS wird dies durch Bindung des T-Zell-Rezeptors (TCR) an ein entsprechendes MHC-Komplex-gebundenes Antigen (pMHC) vermittelt [98], während das initiale Signal für die Bildung der HIV-VS die Bindung des HIV-1 Glykoproteins gp120 an seinen Rezeptor CD4 auf der T-Zelle ist [99].

Dem Migrationsarrest folgend bilden sich IS [100] und VS [101]. Die IS ist durch die aktin-abhängige Relokalisation von Rezeptormolekülen sowie Signalmolekülen charakterisiert. Die reife, monozentrische IS entsteht innerhalb von 10 min und ist aus geordneten Strukturen organisiert, die als zentrales SMAC (*central supramolecular activation cluster* cSMAC), peripheres SMAC (pSMAC), und distales SMAC (dSMAC) bezeichnet werden. Während im cSMAC TCR- und assoziierte Proteine akkumulieren, ist die pSMAC durch ICAM-1, LFA-1 und den Zytoskelett-Linker Talin sowie die dSMAC durch die Präsenz anderer Proteine wie Phosphatasen (CD45) gekennzeichnet [102]. Zusätzlich akkumulieren die Chemokinrezeptoren CXCR4 und CCR5 in der IS-Kontaktfläche [101].

Im Gegensatz zu Zell-Konjugaten ist die VS, die von zwei T-Zellen gebildet wird, durch die Polarisation der HIV-1 Glykoproteine (gp) gp 120 und gp 41 und des Viruskapid-Proteins Gag in der infizierten Zelle sowie der Rekrutierung des HIV-Rezeptors CD4 und der Korezeptoren CXCR4 und CCR5 in der Zielzelle gekennzeichnet. Die Bindung von CD4 an das HIV gp120 induziert rasch die Rekrutierung von CD4, LFA-1 und Talin zur Kontaktstelle auf der Ziel-Zellseite [103]. IS und HIV-VS, die zwischen einer infizierten T-Zelle und einer CD4⁺ Ziel-T-Zelle gebildet werden, haben Ähnlichkeiten. Im cSMAC der VS akkumulieren CD4 und gp120, umgeben von einem Ring von ICAM-1 und LFA-1 Molekülen, die den pSMAC der VS bilden, und der essentiell für deren Ausbildung ist [104]. Zusätzlich polarisie-

Einleitung

ren Tetraspanine, wie CD63, CD81 und CD9 [105], die Integrine ICAM-2 und ICAM-3 [104] und die Lipid Raft-Marker GM-1 und CD59 [106] an der Kontaktstelle der T-Zell-T-Zell HIV-VS. Die Funktion der einzelnen rekrutierten Proteine ist noch nicht vollkommen analysiert. Die Tetraspanine regulieren die Zell-Zell-Fusion und beeinflussen die Virus-Transmission, jedoch nicht die zellfreie Infektion [107]. Die Depletion von Cholesterol in HIV-1 infizierten T-Zellen verhindert die Bildung der VS [106]. Die Inhibition der Umgestaltung des zellulären Aktin-Zytoskeletts in der Ziel-, aber auch in der infizierten Zelle sowie die Inhibition der Tubulin-Reorganisation behindern die Zell-Zell-Ausbreitung des Virus innerhalb der VS [103, 108]. Tatsächlich werden das Mikrotubuli-organisierende Zentrum (MTOC) und weitere Zellorganellen in der Donor-T-Zelle hin zur konjugierten Ziel-Zelle umorganisiert [108, 109]. Die IS kann über Stunden stabil sein, während die Stabilität der VS unklar ist. Abhängig von dem gewählten Versuchsansatz dissoziierte der symmetrische LFA-1 / ICAM-1-Ring des pSMAC in einem ebenen Doppelschicht (*planar bilayer*)-Experiment nach 20-30 min [99], während in einem Zell-Zell-System eine durchschnittliche Dauer von 60 min und eine Mindestdauer von 10 min gemessen wurde [110], und in einer dritten Studie VS von bis zu 50 h Dauer beschrieben wurden [111].

HIV-1 induziert die Ausbildung von Polysynapsen, so dass eine infizierte Zelle auf mehrere konjugierte T-Zellen simultan Viren übertragen kann und so die Effizienz der Transmission erhöht [112]. Außer der VS-abhängigen Zell-Zell-Transmission wurden weitere Übertragungswege für HIV gefunden, z.B. Transmissionen über intrazelluläre Verbindungen, wie Filopodien oder Nanotubes. Filopodien wachsen aus der nichtinfizierten Zelle zur infizierten Zelle und erlauben die Wanderung des Virus auf der äußeren Oberfläche des Filopodiums durch einen retrograden Aktinfluss [113]. Nanotubes verbinden Zellen über mehrere Zelldurchmesser. Der Transfer von HIV-1 über membranöse Nanotubes zu uninfizierten Zellen ist rezeptorabhängig [114].

Einleitung

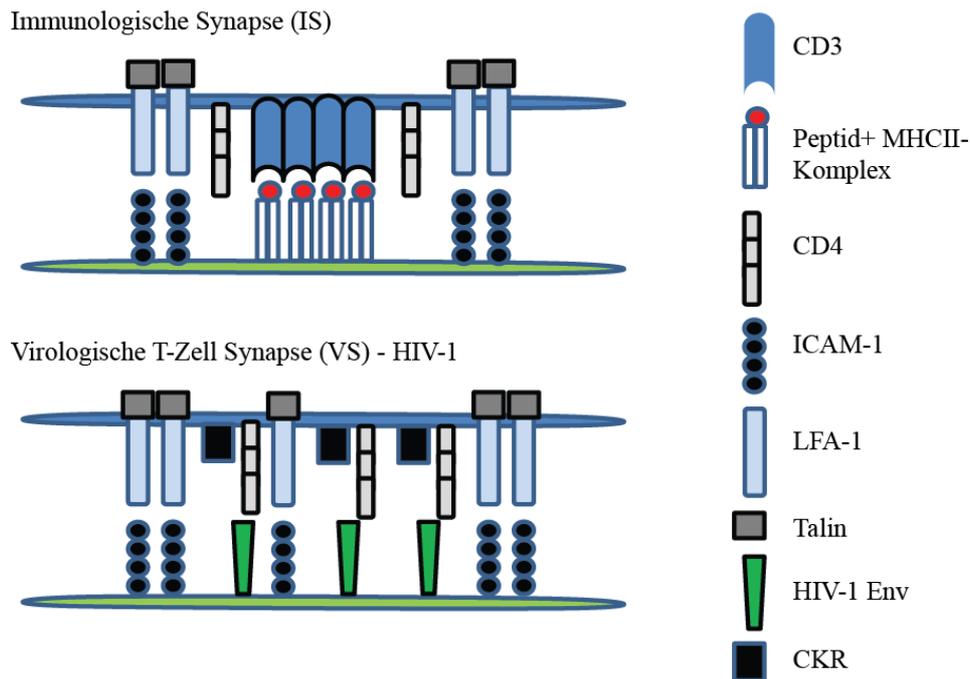


Abb. 1-3: Der Aufbau der IS und VS (modifizierte Abbildung von Jolly and Sattentau, 2004, Traffic)

Im Vergleich zur HIV-VS, die zwischen zwei T-Zellen gebildet wird, ist weniger über die VS bekannt, die zwischen einer HIV-infizierten DC und einer uninfizierten T-Zelle entsteht. Sowohl iDCs als auch mDCs binden HIV-1. mDCs, die infolge dessen nicht infiziert werden, transferieren effizient Virus auf T-Zellen (*trans*-Infektion), während iDCs infektionsabhängig *de novo* synthetisierte Viruspartikel auf T-Zellen übertragen (*cis*-Infektion) [115]. Experimente konnten zeigen, dass die HIV-Transmission von DCs zu T-Zellen über diese 2 Infektionswege in Phasen versetzt verläuft. Innerhalb der ersten zwei Tage der Infektion von DCs polarisiert „getrapptes“ HIV, das in intrazellulären Kompartimenten akkumuliert, zur DC-T-Zell-Synapse (*trans*-Infektion), während später in der Transferphase *de novo* produziertes HIV transferiert wird [116]. Dieses HIV-*Trapping*-Kompartiment wurde in mDCs zuerst als eine intrazelluläre, von der Plasmamembran-separierte, nicht-konventionelle, nicht-lysosomale und endozytotische Vakuole beschrieben, mit der die Tetraspanine CD9, CD81, CD82 assoziiert sind [117]. Spätere Experimente konnten zeigen, dass das HIV-Kompartiment mit der Zelloberfläche verbunden ist [118]. Jedoch ist das tetraspaninreiche Kompartiment nicht nur für „getrapptes“ HIV von Bedeutung, sondern es ist auch der Ort der Virus-Replikation in iDCs [119]. Die Bedeutung dieses Kompartimentes wird deutlich durch seine Polarisierung zur VS und dem Transfer von Virionen kurz nach einem T-Zell-Kontakt [118]. Dieses intrazelluläre, HIV-positive Kompartiment konnte auch in Makrophagen detektiert werden [120]. Der Kontakt einer infizierten DC mit CD4⁺ T-Zellen induziert die Polarisierung viraler Proteine

Einleitung

und Tetraspanine in DCs sowie CD4, CKR und LFA-1, jedoch nicht MHC II und CD3, in T-Zellen [117]. Die Blockade der ICAM-1 / LFA-1 Interaktion resultiert in einer deutlichen Minderung der Virus-Transmission (*trans*-Infektion). HIV-Transmission erfolgt jedoch unabhängig von ICAM-2 und -3 [121]. Die Umgestaltung des Zytoskeletts ist auch kritisch für die Bildung der DC / T-Zellen-VS, denn eine Störung beeinträchtigt den Aufbau und inhibiert die Transmission (*trans*-Infektion) [122]. DC-SIGN lokalisiert ebenfalls in der VS und scheint eine wesentliche Funktion in der Polarisierung viraler Proteine zur VS und daraus folgend für die Effizienz der VS-Ausbildung zu besitzen [123]. Die Bindung von HIV-1 und DC-SIGN aktiviert den *Guanine Exchange Factor* (GEF) LARG, der zum einen für die Bildung der VS gebraucht wird und zum anderen die Ausbildung von membranösen Ausläufern induziert. Diese Ausläufer erhöhen die Effizienz der HIV-Transmission [124].

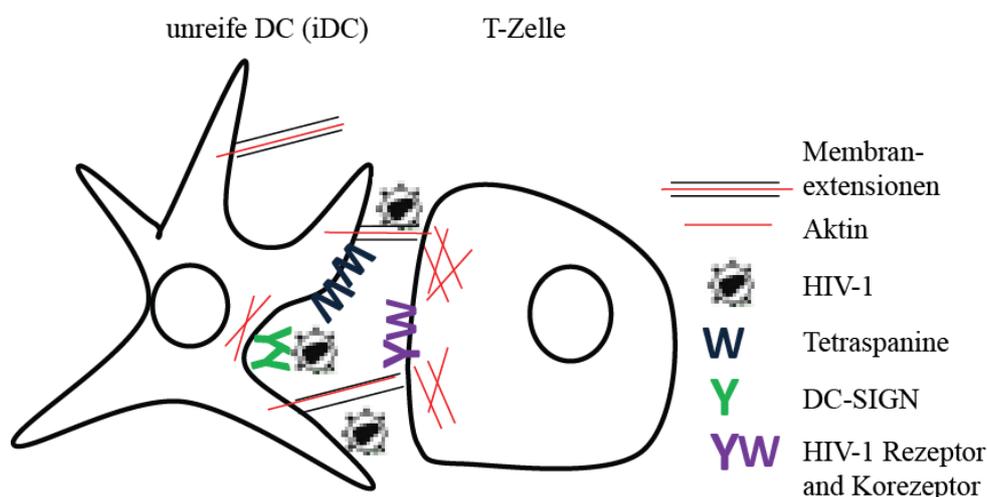


Abb. 1-4: Virologische Synapse zwischen einer HIV-infizierten DC und einer nicht infizierten T-Zelle (modifizierte Abbildung aus Lehmann et al., 2011, Viruses)

Im Gegensatz zur HIV-VS ist über die zell-assoziierte MV-Infektion und die potentielle Bildung einer VS wenig bekannt. Jedoch ist die Zell-Zell-Interaktion für die Übertragung des MV von großer Bedeutung. In Kokulturen induziert die Interaktion von MV-DCs und T-Zellen die Ausbildung von Synzytien und erhöht CD40-abhängig die Replikation in DCs [18]. Es konnte belegt werden, dass die MV-Replikation in DCs ausreichend ist, um Virus zu T-Zellen und uninfizierten DCs zu transferieren. Am 4. Tag der Kokultur exprimierten T-Zellen das MV H-Protein [17]. DC-SIGN⁺ DCs vermitteln die infektionsunabhängige Transmission des MV (*trans*-Infektion) an CD4⁺ und CD8⁺ T-Lymphozyten *in vitro*. Die Weitergabe von *de novo* gebildeten Partikeln (*cis*-Infektion) ist außerdem abhängig von der Expression von CD150 [20].

Einleitung

Das gegenwärtige Modell der initialen MV-Infektion und der Ausbreitung des MV in sekundäre lymphatische Organe sieht vor, dass gewebsspezifische DCs und/oder Makrophagen im Respirationstrakt die ersten Ziel-Zellen sind, die entweder CD150-abhängig infiziert werden oder MV über DC-SIGN nur binden, aber nicht aufnehmen. Die MV-Interaktion induziert die Migration von DCs zu sekundären lymphatischen Organen, wo sie T-Zellen Antigen präsentieren. Drei Situationen sind möglich: T-Zellen 1) erkennen Antigen und werden bei Präsenz kostimulatorischer Moleküle aktiviert, 2) erkennen Antigen, erhalten jedoch keine kostimulatorischen Signale und werden anergisch 3) oder werden infiziert.

Die VS, die unabhängig von Antigenerkennung entsteht, muss DC / T-Zell Konjugate so lange stabilisieren, bis MV effizient transmittiert werden kann. Die Architektur der VS, die zwischen MV-DCs und T-Zellen gebildet wird, wurde noch nicht beschrieben.

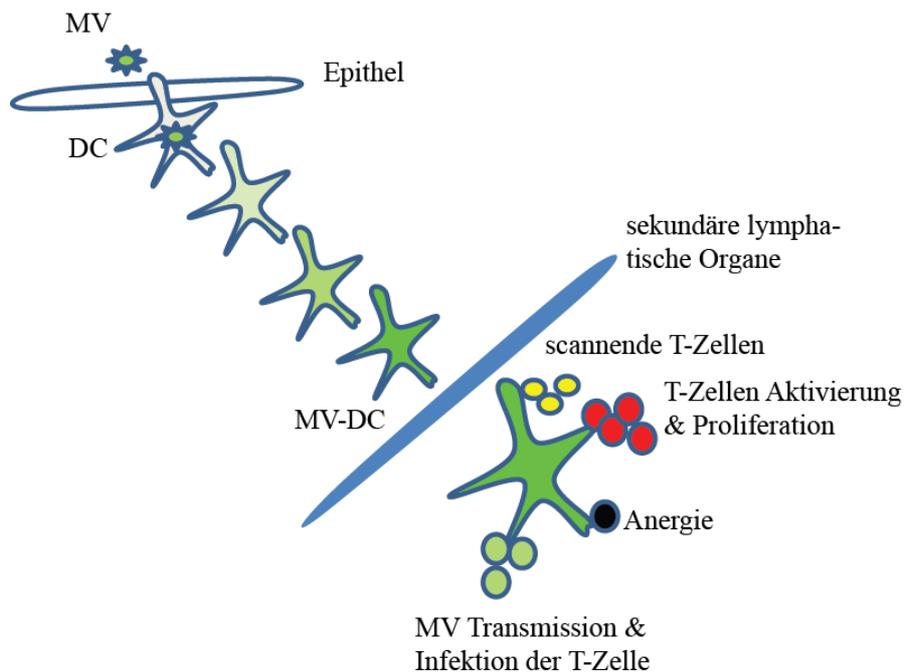


Abb. 1-5: Modell der MV-Aufnahme, Infektion von DCs und Transmission an T-Zellen in sekundären lymphatischen Organen.

1.4 Fragestellung

Dendritische Zellen (DC) erkennen Pathogene und initiieren nach erfolgter Reifung und Migration in sekundäre lymphatische Organe spezifische adaptive Immunität. Einige Pathogene, einschließlich des Masernvirus (MV), könnten DCs als Trojanische Pferde ausnutzen und erhalten so Zutritt zu Kompartimenten, die die Transmission an T-Zellen erlauben und damit die Dissemination des Virus ermöglichen.

Das MV infiziert iDCs nach CD150-abhängiger und DC-SIGN-unterstützter Aufnahme. Die Infektion fördert die Ausreifung der DCs, begleitet durch eine Mobilisierung der Zellen. *In vitro* produzieren DCs ineffizient infektiöse virale Partikel, obwohl virale Transkripte und Proteine akkumulieren. Dies führte zu der Annahme, dass späte Stufen des MV-Lebenszyklus gestört oder verändert sind, wie z.B. der intrazelluläre Proteintransport, der essentiell für den Zusammenbau sowie die Freisetzung der viralen Partikel ist.

Die Ziele der vorliegenden Arbeit waren die Charakterisierung der subzellulären Verteilung viraler und zellulärer Proteine, die wesentlich für den Zusammenbau und die Freisetzung viraler Partikel sind. Zuerst sollte die Akkumulation und subzelluläre Verteilung viraler Proteine und die Produktion infektiöser Viren in DCs mit der von permissiven und effizient partikelbildenden B-Zelllinie B95a verglichen werden. Im Besonderen sollte die Lokalisation des MV M-Proteins analysiert werden, das sowohl für die Organisation des Zusammenbaus als auch für die Partikelfreisetzung von großer Bedeutung ist.

Um den M-Proteintransport in lebenden Zellen untersuchen zu können, sollte ein rekombinantes rMV323 M-TC generiert werden, das einen C-terminalen, an das M-Protein fusionierten Tetracystein-Tag enthält. Das rekombinante M-Protein sollte funktionell untersucht sowie die Replikationskinetik der MV-Rekombinante und deren Eignung für *Live cell* Experimente ermittelt werden.

Da DCs sehr ineffizient freies MV produzieren, erschien es wahrscheinlich, dass die zellvermittelte Transmission an T-Zellen über eine der für HIV beschriebenen virologischen Synapsen ähnliche geordnete Struktur erfolgt, in der virale Proteine, Eintrittsrezeptoren und stabilisierende Oberflächenproteine polarisieren. Um die Architektur der Masernvirus-induzierten VS zu entschlüsseln, sollten autologe MV-infizierte DC / T-Zell-Konjugate analysiert werden.

2 Material

2.1 Zellen

2.1.1 Zelllinien

Die verwendeten Zelllinien waren alle in der Arbeitsgruppe von Sibylle Schneider-Schaulies und Jürgen Schneider-Schaulies im Institut für Virologie und Immunbiologie verfügbar.

Zelllinie	Ursprung	Medium
B95a	Epstein-Barr-Virus (EBV)-transformierte B Zelllinie, Krallenaaffe (<i>Callithrix jacchus</i>), semi-adhären	RPMI 1640 5% Fötale Kälberserum (FCS)
BJAB	Humane EBV-negative lymphoblastoide Zelllinie, Suspensionzellen	RPMI 1640 10% FCS
Vero	Epithelzelllinie (Niere), <i>Cercopithecus aethiops</i> , adhären	MEM 5% FCS
Vero SLAM	Epithelzelllinie (Niere), <i>Cercopithecus aethiops</i> , stabile Expression von CD150/SLAM, adhären	RPMI 1640 10% FCS
HeLa	Humane Epithelzelllinie (Cervix), adhären	MEM 5% FCS
293 T	Humane Epithelzelllinie (Niere, embryonal), stabile Expression des SV 40 T Antigens, semi-adhären	MEM 10% FCS

Tabelle 2-1: Verwendete Zelllinien

Material

2.1.2 Primäre Zellen

Ankonzentriertes humanes Blut wurde von der Abteilung für Transfusionsmedizin der Universitätsklinik Würzburg bereitgestellt. Primäre Zellen wurden aus Leukozytendepletionsfiltern durch Dichtezentrifugation isoliert (Abschnitt 3.1.6)

2.2 Bakterien

Für die Transformation von Plasmiden wurden *E. coli* Top10 (Invitrogen) verwendet.

2.3 Masernviren

Alle Masernviren (MV)-Stämme außer rMV323 M-Tetracycline (TC) und rMV ED M-TC waren in der Arbeitsgruppe verfügbar. Die Stämme rMV323 M-TC und rMV ED M-TC wurden von Linda Rennick, Centre of Cancer Research and Cell Biology, School of Biomedical Sciences, Queen's University of Belfast, Northern Ireland, bereitgestellt.

Virus	Rezeptorbenutzung	Viruszucht auf
Wildtyp Fleckenstein (WTF), Wildtypvirus	CD150	BJAB
rMV IC323-GFP, Wildtypvirus, kodiert GFP an der ersten Position	CD150	Vero SLAM
rMV323 M-TC, Wildtypvirus, kodiert M-TC-Fusionsprotein	CD150	Vero SLAM
Edmonston (ED), Vakzinestamm	CD46, CD150	Vero
rMV ED M-TC, Vakzinestamm, kodiert M-TC-Fusionsprotein	CD46, CD150	Vero

Tabelle 2-2: Verwendete MV-Stämme

Material

2.4 Plasmide

Plasmid	Kodiertes Protein	Erhalten von
pCG-M (WTF)	M-Protein, MV, WTF	I.Johnston, Würzburg
pCG-M (ED)	M-Protein, MV, ED	W.P. Duprex, Belfast
pCG-M323-TC, 6aa	M-TC Fusionsprotein, MV, IC323, 6aa TC tag	L. Rennick, Belfast
pCG-M323 FlAsh, 12aa	M-TC Fusionsprotein, MV, IC323, 12aa TC tag	L. Rennick, Belfast
pCG-M ED-TC, 6aa	M-TC Fusionsprotein, MV, ED, 6aa TC tag	L. Rennick, Belfast
pCG-M ED FlAsh, 12aa	M-TC Fusionsprotein, MV, ED, 12aa TC tag	L. Rennick, Belfast
pCG-CD150-HA	CD150-HA Fusionspro- tein	E. Avota, Würzburg

Tabelle 2-3: Verwendete Plasmide

2.5 Primäre Antikörper

2.5.1 Modifizierte Primärantikörper

Die aufgelisteten Antikörper wurden von BectonDickinson bezogen, sind monoklonale Maus-Antikörper, und wurden für die für die durchflusszytometrische Analyse primärer Zellen benutzt.

Epitop	Klon	Isotyp	Verdünnung
α – CD3-PE	UCHTI	IgG1,k	1:100
α - CD11c-PE	B-ly6	IgG1,k	1:50

Material

α - CD14-FITC	M ϕ P9	IgG2b	1:50
α - CD16-PE	3G8	IgG _{1,k}	1:50
α - CD19-FITC	HIB19	IgG _{1,k}	1:50
α - CD25-PE	M-A251	IgG _{1,k}	1:50
α - CD56-PE	B159	IgG _{1,k}	1:50
α - CD83-PE	HB15e	IgG _{1,k}	1:50
α - CD86- FITC/APC	FUN-1	IgG _{1,k}	1:50
IgG ₁ - FITC/PE/APC	MOPC-21	IgG _{1,k}	1:50

Tabelle 2-4: Modifizierte Primärantikörper

2.5.2 Unmodifizierte Primärantikörper

Epitop	Klon	Isotyp / Ursprung	Hersteller	WB	FACS	IF
MV Serum		Human	IVW			1:1000
α -M (Masern)	MAB 8910	Maus-IgG1	Chemicon	1:2000	1:250	1:200
α -P (Masern)	SA2607/2 608	Kaninchen				1:200
α -N (Masern)	F227	Maus-IgG2a	IVW		1:50	1:400
α -H (Masern)	K83 L77 NC32	Maus-IgG2a	IVW		1:100	1:500
α -F (Masern)	A5047	Maus-IgG1	IVW		1:50	1:50 (4°C)
α - CD3	UCHT1	Maus-IgG ₁ , k	BD		α CD3/CD28 Stimulation	

Material

α – CD3E	M20	Ziege,	SCB		1:500
α – CD9	K41	Maus-IgG1	IVW	1:50	1:100
	1,9 mg/ml				
α – CD28	CD28.2	Maus-IgG1, k	BD	α CD3/CD28 Stimulation	
α – CD53	Z53.1	Maus	IVW		1:200
α – CD63	MX- 49.129.5	Maus-IgG1	SCB	1:500 oN	1:200
α – CD71	PAL-M1	Maus-IgG1	SCB		1:100
α – CD71		Ziege	SCB		1:500
α – CD81	Z81.1	Maus-IgG1, k			1:200
α – CD150	5C6 F1	Maus-IgG1,k	IVW	1:300 oN	1:50
α – CD150	IPO3	Maus-IgG1	Cayman Chemicals	1:400	1:500 oN
α – DC-SIGN	D2	Maus	T. Gejtenbeek (Amsterdam)	1:50	
α – DC-SIGN	H200	Kaninchen	SCB		1:50 oN
α -ICAM-1	Rek-1	Maus		1:50	1:300
α -LFA-1	L15	Maus			1:200
α -LAMP 1	931 A	Kaninchen			1:2000
FK-2 (DALIS)	FK2	Maus-IgG1	biomol		1:800
α -EEA1		Kaninchen	Affinity Biore- agents		1:100
panMHC II	FN1	Maus			1:100
α -HRP	ab2109	Ziege	Abcam		1:1000
α -TGN 46		Kaninchen	Abcam		1:500
α -ERGIC 53		Kaninchen	SIGMA		1:100

Material

α -COPI	M3A5	Maus-IgG1	SIGMA	1:25
α -Calnexin		Kaninchen	SIGMA	1:200
α -AP3mu (α -p47A)	26/P47A	Maus-IgG1	BD	1:100
α -HA	F-7	Maus	SCB	1:50
α -HA	Y11	Kaninchen	SCB	1:50
α -GM130 (cisGolgi)		Maus		1:150
α -LC3		Kaninchen	J. Zevenhoven- Dobbe, Leiden	1:200
Isotyp (VSV- G Protein)	I1	Maus-IgG1	IWV	1:50

Tabelle 2-5: Unmodifizierte Primärantikörper. IVW = Institut für Virologie / Würzburg, SCB = Santa Cruz Biotechnology, IF = Immunfluoreszenz, WB = Western Blot

2.5.3 Sekundärantikörper

Name	Ursprung	Hersteller	WB	FACS	IF
F(ab') ₂ Fragment anti-Maus IgG-FITC	Ziege	Dianova		1:100	
anti-Human IgG (H+L) - A 488	Ziege	Beckman Coulter		1:100	
anti-Human IgG (H+L) - A 488	Ziege	Molecular probes			1:800
anti-Maus IgG (H+L) – A 488	Kaninchen	Molecular probes			1:800
F(ab') ₂ Fragment anti-Maus IgG (H+L) – A 594	Ziege	Molecular probes			1:800
anti-Maus IgG (H+L) – A647	Ziege	Molecular probes		1:400	1:800

Material

anti-Maus IgM (μ -Kette) – A 594	Ziege	Molecular probes	1:200
anti-Ziege IgG (H+L) – A 594	Huhn	Molecular probes	1:800
anti-Kaninchen IgG (H+L) – A 488	Huhn	Molecular probes	1:800
anti-Kaninchen IgG (H+L) – A 594	Huhn	Molecular probes	1:800
anti-Kaninchen IgG (H+L) – HRP	Ziege	Cell signalling	1:2000
anti-Maus IgG (H+L) - HRP	Ziege	Dianova	1:10000
anti- Ziege IgG (H+L) - HRP	Maus	Dianova	1:5000
anti-Maus IgG (H+L) unkonjugiert	Ziege	Dianova	CD3/CD28 Stimulation

Tabelle 2-6: Sekundärantikörper. A = Alexa Fluor, WB = Western Blot, IF = Immunofluorescence

2.6 Fluoreszierende Farbstoffe

Name	Spezifische Färbung von	Hersteller	Verdünnung
LysoTracker Red DND-99	Lysosomen	Molecular probes	1:2000
Phalloidin A488	F-Aktin	Molecular probes	1:75 (1% BSA/PBS-, 30 min, 4°C)
Wheat germ agglutinin (WGA) A488	Sialinsäurereste	Molecular probes	1:1000 (1% BSA/PBS-/-, 15 min, 4°C)

Material

DRAQ5	Zellkern	Molecular probes	1:2500 (1% BSA/PBS-, 10 min, 4°C)
DAPI	Zellkern		(1% BSA/PBS-, 5 min, 4°C)
FITC-Dextran	Endozytotische Vesikel	SIGMA	
FlAsH	TC-Färbung	Invitrogen / Carsten Hoffmann	
ReAsH	TC-Färbung	Invitrogen	

Tabelle 2-7: Fluoreszierende Farbstoffe. A = Alexa Fluor, BD = BectonDickinson, TC = Tetracysteine

2.7 Zellkulturmedien und Zusätze

Ist kein Hersteller angegeben, wurden die Zellkulturmedien und Zusätze in der Medienküche des IVW produziert.

2.7.1 Eukaryontische Zellen

Medium	Hersteller
RPMI 1640	
MEM	
5.6 % NaHCO ₃	
ATV	
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco® / Invitrogen
Penicillin / Streptomycin (100 I.E. / ml)	
Ciprofloxacin	Bayer
IL-4	Miltenyi Biotech
GM-CSF	Berlex
Lipopolysaccharid (LPS)	Sigma Aldrich
Fusioninhibitorisches Peptid (FIP) (Z-D-Phe-L-Phe-Gly-OH)	Bachem

Material

Die Medien MEM und RPMI1640 wurden immer mit 15 ml 5.6 % NaHCO₃ gepuffert und mit einem Röhrchen Antibiotika (Penicillin und Streptomycin) versetzt.

2.7.2 Bakterien

Medium	Zusammensetzung
LB Medium	10g Bacto-Trypton 10g NaCl 5g Hefeextrakt ad 1 l <i>Aqua bidest</i>
LB Agar	wie LB Medium + 15 g Agar-Agar ad 1 l <i>Aqua bidest</i>
Ampizillin Selektionsagar	wie LB Medium + 50µg/ml Ampizillin ad 1 l <i>Aqua bidest</i>

2.7.3 Kits

Medium	Provider
Bicinchoninic Acid (BCA) Kit (Proteinkonzentration)	SIGMA
ECL Detektionsreagenz	Amersham
EndoFree® Plasmid Maxi Kit	Qiagen
Zenon® Labelling Kit für IgG1-Antikörper – AlexaFluor 488 & 594	Invitrogen

Material

2.8 Reagenzien, Puffer und Lösungen

30 mM Anodenpuffer	3.6 g Tris 200 ml Methanol ad 1 l <i>Aqua bidest</i> , pH 10.4
300 mM Anodenpuffer	36 g Tris 200 ml Methanol ad 1 l <i>Aqua bidest</i> , pH 10.4
6x SDS-Probenpuffer (SLB)	0.5 g Tris pH 6.8 0,4 % SDS 6 ml Glycerol 0.6 ml β -Mercaptoethanol 2.4 mg Bromphenol blau ad 20 ml <i>Aqua bidest</i>
10x Agarose-Laufgel-Puffer	144.0 g Glycin 30.3 g Tris 50 ml 20% SDS ad 1 l <i>Aqua bidest</i> , pH 7.8
Brij Lysepuffer (Dichtegradientenzentrifugation)	25mM Tris-HCl, pH 7.5 150 mM NaCl 5 mM EDTA 1 mM NaF 0.1 % Brij 98 Roche Proteaseinhibitor Cocktail (1 Tablette / 50 ml) ad 100 ml <i>Aqua bidest</i>
FACS-Puffer	0.5 % BSA 0.02 % NaN ₃

Material

in PBS (Ca²⁺ - and Mg²⁺)

FlAsH / ReAsH Markierungspuffer	150 mM NaCl 10 mM HEPES 10 mM Glukose 2.5 mM KCl 4 mM CaCl ₂ 2 mM MgCl ₂
Einfriermedium	10 % DMSO in FCS
Kathodenpuffer	5.2 g Hexansäure 3.0 g Tris 20 % Methanol ad 1 l <i>Aqua bidest</i> , pH 9.4
Milch-Blockingpuffer	5 % Milchpulver 0.05 % Tween 20 ad PBS
NP-40 Lysepuffer	120 mM NaCl 50mM HEPES, pH 7.4 40 mM β-Glycerolphosphate 10 mM NaF 1 mM EDTA 1 % NP-40 Roche Proteaseinhibitor Cocktail (1 Tablette / 50 ml) ad <i>Aqua bidest</i> , pH 7.2
NTE-Puffer	100 mM NaCl 10 mM Tris-HCl, pH 7.4 1 mM EDTA

Material

ad *Aqua bidest*, pH 7.2

PBS (Ca²⁺ - and Mg²⁺ - frei) (PBS-/-)

80 g NaCl
2 g KCl
11.5 g Na₂HPO₄ x H₂O
2 g KH₂PO₄

ad 1 l *Aqua bidest*

Saponin FACS-Puffer

0.33 % Saponin
in FACS-Puffer

Stripping Puffer

62.5 mM Tris-HCl, pH 6.7
2 % SDS
7 ml β-Mercaptoethanol / 1 l

Natriumazid (NaN₃)

32 %

TE-Puffer

10mM Tris-HCl
ad 1 l *Aqua bidest*, pH 8.5

Tween 20-Permeabilisierungspuffer

0.05 % Tween 20
1 % BSA
in PBS (Ca²⁺ - and Mg²⁺ frei)

Trypanblau

0.25 % Trypanblau
in PBS (Ca²⁺ - and Mg²⁺ frei)

Versene

1 g KCl
1 g KH₂PO₄
2.86 g Na₂HPO₄
41 g NaCl
1 g Versene
ad 5 l *Aqua bidest*

2.9 Chemikalien

Chemikalie	Hersteller
Acrylamide	Applichem
Agarose	Applichem
Ammoniumchlorid	Applichem
Ammoniumpersulfat	SIGMA
BAL (2,3 Dimercaptopropanol)	Invitrogen
Brij 98 - Lysepuffer	SIGMA
Bromphenolblau	SIGMA
BSA	Applichem
Chloroquine	SIGMA
Ciprofloxacin	Bayer
<i>Complete EDTA-free Protease Inhibitor-Tablette</i>	Roche
DMSO	Applichem
EDT	Merck
EDTA	Sigma Aldrich
Ethanol	Applichem
Ficoll	Amersham
Fluoromount-G	Biozol
Glukose	Applichem
Glutaraldehyde	Roth
Glycerol	Applichem
β -Glycerolphosphat	Applichem
Glycin	Applichem
HEPES	Applichem
Hexansäure	SIGMA
Kupfer(II)sulfat	SIGMA
LY294002	Calbiochem
Methanol	Applichem
NP-40	Calbiochem
Paraformaldehyd	Applichem

Material

Poly-L-lysin	SIGMA
Proteinstandard (1 mg/ml)	SIGMA
Saponin	SIGMA
SDS	Applichem
Sucrose	Applichem
TEMED	Applichem
Tris	Applichem
Triton X-100	SIGMA
Tween 20	SIGMA

2.10 Verbrauchsmaterialien

0.5, 1.5, 2 ml Reaktionsgefäße	Eppendorf
6-, 12-, 24-, 48 – Napf-Zellkulturplatte	Greiner
15 , 50 ml Falcon-Röhrchen	Greiner
50-, 250, 550 ml Zellkulturflaschen	Greiner
Zellschaber	Hartenstein
<i>Chamber Slides</i> , Lab – Tek II	Nunc
Kryoröhrchen	Greiner
FACS-Röhrchen	Falcon
Pipetten mit Spitzen	Greiner

2.11 Equipment

Konfokales Laserscanning Mikroskop LSM 510 Meta ausgestattet mit Axiovert 200-Mikroskop	Zeiss
Zentrifugen	Eppendorf, Hettich, Sorvall
FACS Calibur - Durchflusszytometer	BD
Inkubator	Nuaire
Optisches Lichtmikroskop Labovert FS	Leitz
pH-Meter	Mettler Toledo
Photometer	Eppendorf

Vortex Genie 2

Bender & Hobein AG

2.12 Software

AIDA Image Analyzer

Raytest

Cell Quest Pro

BD

FlowJo

Tree Star Inc.

WCIF Image J

NIH

LSM Image Browser

Zeiss

Prism

GraphPad

3 Methoden

3.1 Zellkultur

Die verwendeten Zellen und Zelllinien wurden entweder in Plastikflaschen oder Zellkulturplatten im Brutschrank bei 37°C in wasserdampfhaltiger Atmosphäre und 5 % CO₂-Gehalt kultiviert.

3.1.1 Zellkultur adhärenter und semiadhärenter Zelllinien und Suspensionszelllinien

Die verwendeten Zelllinien wurden in der Tabelle 2-1 zusammengefasst. Adhärente Zelllinien wurden nach der Ausbildung eines konfluenten Zellrasens mit PBS-/- gewaschen, mit ATV abgelöst und mindestens 1:4 gesplittet. Semi-adhärente Zellen wurden durch mehrfaches Abspülen des Zellrasens mit PBS-/- abgelöst und mindestens 1:4 gesplittet. Suspensionszellen wurden geerntet, abzentrifugiert, in Medium resuspendiert und mindestens 1:4 gesplittet.

3.1.2 Bestimmung der Lebendzellzahl

Um die Zahl lebender Zellen zu bestimmen, wurde der Vitalfarbstoff Trypanblau verwendet. Dazu wurden die Zellen im Medium resuspendiert, ein Aliquot der Zellsuspension wurde 1:2, 1:4 oder 1:10 mit Trypanblau gemischt, das nur von toten Zellen aufgenommen werden kann. 10 µl wurden anschließend in eine Neubauer Zellkammer gegeben, die Zahl lebender, ungefärbter Zellen wurde im Lichtmikroskop bestimmt und mithilfe der folgenden Gleichung errechnet.

$$\text{Lebendzellzahl} = \frac{\text{gezählte Zellen} \times \text{Verdünnungsfaktor}}{\text{Anzahl der ausgezählten Quadrate}} \times 10^4$$

Methoden

3.1.3 Kryokonservierung & Auftauen von Zelllinien

1 – 2.5×10^6 abgelöste Zellen wurde mit PBS-/- gewaschen, zentrifugiert. Die Zellen wurden in 1 ml Einfriermedium auf Eis aufgenommen, 1 h bei -20°C und danach auf -80°C eingefroren. Um kryokonservierte Zellen wieder in Kultur zu nehmen, wurden die Zellen schnell bei 37°C im Wasserbad aufgetaut und sofort in 50 ml vorgewärmten Medium gewaschen. Das Pellet wurde in frischem Medium aufgenommen und am nächsten Tag wurde das Medium nochmals gewechselt.

3.1.4 Isolation von PBMCs

Ankonzentriertes humanes Blut aus Leukozytendepletionsfiltern vom Institut für Transfusionsmedizin diente als Quelle für PBMCs. Für die Aufreinigung wurde das Blut 1:5 mit Versene verdünnt. In einem 50 ml Falcon-Röhrchen wurden 9 ml Ficoll-Plaque vorgelegt und mit 40 ml Blut überschichtet. Durch die anschließende Dichtezentrifugation wurden die Erythrozyten von den PBMCs separiert (2 min Anlauf, 1.200 rpm, 30 min, 2 min Auslauf, 25°C). Die ankonzentrierten PBMCs wurden abgenommen und zweimal mit vorgewärmten PBS-/- gewaschen.

3.1.5 Isolierung von Monozyten, *in vitro* Differenzierung in unreife DCs (iDC) und Ausreifung von DC (mDCs)

Für die Isolierung von Monozyten wurden die geernteten PBMCs in 50 ml vorgewärmten 10% RPMI aufgenommen und je 25 ml in große Zellkulturflaschen überführt. Die Monozyten adhärten an dem Boden der Plastikflasche. T- und B-Zellen sowie NK-Zellen blieben im Überstand. Nach 1-2 h wurde das Medium abgenommen und frisches Medium zugegeben. Innerhalb der nächsten 24 h lösten sich die Monozyten vom Plastikboden ab, und konnten so aus dem Überstand geerntet werden. Die Zellen wurden gezählt und mit einer Konzentration von 5×10^5 Zellen / ml für die Differenzierung eingesetzt. Um eine Differenzierung in iDCs zu erreichen, wurde 500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4 zugegeben. Zwei Tage später wurde das Medium gewechselt und mit frischen Zytokinen versetzt. Nach drei Tagen Kultur in zytokinhaltigem Medium verloren die Monozyten den zelltypischen Oberflächenmarker

Methoden

CD14 und exprimierten die typischen Marker CD1a, CD11c, CD80^{niedrig}, CD86^{niedrig}, HLA-DR^{niedrig} unreifer DCs. Um DCs auszureifen, wurde 100 ng/ml LPS hinzugegeben und nach 24 h exprimierten die mDCs die typischen Reifungsmarker CD83 sowie hohe Niveaus von CD80, CD86 und HLA-DR.

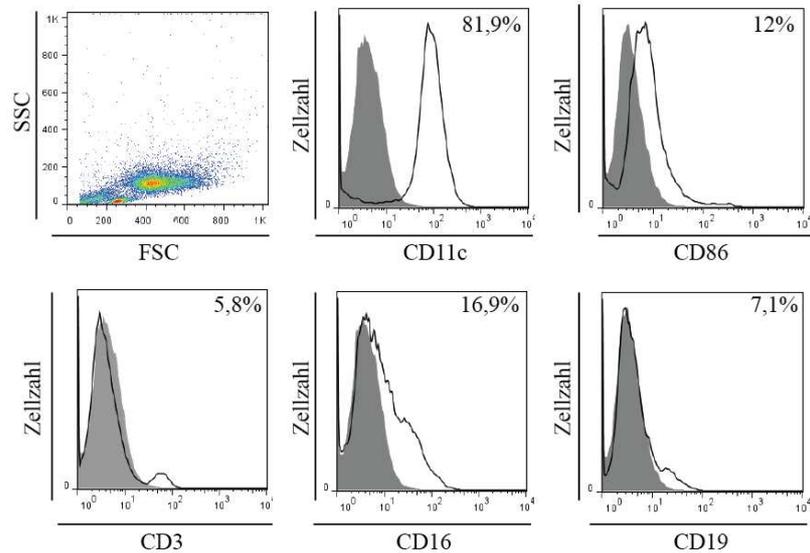


Abb. 3-1: Charakterisierung aufgereinigter iDCs. Die aufgereinigten iDCs wurden nach 3 Tagen Kultivierung in Gegenwart von GM-CSF und IL-4 auf die Expression iDC-typischer Oberflächenmarker CD11c⁺ und CD86^{niedrig} untersucht. Um die Reinheit der iDC-Population zu bestimmen, wurde zusätzlich die Expression der Oberflächenmarker von T-Zellen (CD3), Makrophagen und NK-Zellen (CD16) und B-Zellen (CD19) bestimmt (grau gefülltes Histogramm: Isotypkontrolle).

3.1.6 Aufreinigung und Aktivierung von T-Zellen

Für die Anreicherung von T-Zellen wurden die unterschiedlichen Bindungsaffinitäten mononukleärer Zellen an Nylon ausgenutzt. Im Unterschied zu B-Zellen weisen T-Zellen eine niedrige Bindungsaffinität auf. Die Bindung an Nylon ist abhängig von der Temperatur und dem FCS-Gehalt des verwendeten Mediums. PBMCs wurden gezählt und 2×10^8 Zellen wurden in 7 ml 5% RPMI resuspendiert. Vorher wurde eine 50 ml Spritze mit 2 g Nylonwolle gestopft und autoklaviert. Ein Plastikschlauch wurde am unteren Ende der Säule befestigt und mit einer Metallklemme verschlossen. Die Säule wurde mit 5% RPMI äquilibriert und die Luftblasen wurden entfernt. Die PBMCs wurden zugegeben, nochmals Medium hinzugefügt und für 45 min im Inkubator (37°C) inkubiert. Anschließend wurde die Wolle mehrmals mit 5% RPMI gewaschen und der Durchfluss wurde jeweils aufgefangen. Die Zellen wurden durch Zentrifugation (1.200 rpm, 5 min, RT) pelletiert, in 10% RPMI resuspendiert und gezählt. Zur Kultivierung der Zellen wurde die Zellkonzentration auf 4×10^6 / ml eingestellt.

Methoden

Um die T-Zellen zu aktivieren, wurden 2 verschiedene Protokolle verwendet. Für die Aktivierung mittels PMA / Ionomycin (iono) (P/I) wurde 40 ng/ml PMA und 0.5 μ M iono zugegeben und für 2 Tage inkubiert. Zum anderen wurden die T-Zellen durch Kreuzvernetzung von CD3 und CD28 mithilfe von Antikörpern stimuliert. Dafür wurden 5 μ g/ml Sekundärantikörper Ziege anti-Maus IgG1 in 500 μ l 25 mM Tris (pH 9.0) verdünnt, in einen Napf einer 24-Napfplatte pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Danach wurde der Napf gewaschen und im Kühlschrank gelagert bis die Zellen fertig waren. 1.2×10^6 / 500 μ l T-Zellen wurden für 20 min auf Eis mit Antikörpern inkubiert, die spezifisch für CD3 (1 μ g/ml) und CD28 (1 μ g/ml) waren und anschließend in den vorbereiteten Napf überführt. Nach 2 Tagen wurde die Aktivierung der T-Zellen durch eine CD25-Oberflächenexpression im Durchflusszytometer bestätigt.

3.2 Virologische Methoden

3.2.1 Präparation von Virusstocks

Die verwendeten MV Wildtyp- und Vakzinestämme sind in der Tabelle 2-2 aufgeführt. Der WTF-Stamm wurde auf der B-Zelllinie BJAB gezogen. Zuerst wurde eine Präinfektion mit 50×10^6 Zellen angesetzt. Dafür wurden die Zellen mit MV WTF (MOI 0.01) in einem kleinen Volumen 0% RPMI für 1-2 h infiziert. Anschließend wurden die Zellen gewaschen (300x g, 5 min, RT) und so lange in 100 ml 10% RPMI in einer mittleren Flasche kultiviert bis der Großteil der Zellen fusioniert vorlag. Dann wurden 10 ml der Präinfektion auf eine dicht gewachsene große Flasche von BJABs verteilt, so dass insgesamt 10 Flaschen für die Infektion bereitgestellt wurden. Zusätzlich wurde 10 weiteren Flaschen für die Mockpräparation verwendet. Die Hauptinfektion wurde ein Tag später geerntet, wenn 80-90% der Zellen einen zytopathischen Effekt (CPE) aufwiesen. Dafür wurden die Zellen abzentrifugiert und das Pellet in 1-2 ml 0% RPMI auf Eis resuspendiert, gepoolt und auf -80°C eingefroren. Einen Tag später wurde das Zellpellet auf Eis aufgetaut, für 1-2 min gevortext und dann zentrifugiert (1.000 x g, 15 min, 0°C) um Zelltrümmer zu entfernen. Der Überstand enthielt die viralen Partikel, die aliquotiert und auf -80°C eingefroren wurden.

Die rekombinanten Wildtyp-Stämme IC323-GFP und rMV323 M-TC wurden auf den adherenten Zelllinie Vero gezogen, die stabil den MV-Eintrittsrezeptor CD150 / SLAM (Vero

Methoden

SLAM) exprimieren. Für die Viruszucht der Vakzinestämme MV ED und des rekombinanten rMV ED M-TC wurden die Vero-Zellen benutzt. Allgemein wurden die Zellen in großen Flaschen für die Viruszucht verwendet, wenn der Zellrasen zu 70 % konfluent waren. Die Zellen wurden gezählt, in 0 % RPMI resuspendiert und mit MV (MOI 0.01) für 1–2 h bei 37°C infiziert. Danach wurde das Medium gewechselt und frisches Medium zugegeben. Die infizierten Zellen wurden bei 33°C kultiviert, um die Infektion zu verlangsamen und die Titer zu erhöhen. Wenn 80 – 90% der Zellen einen ausgeprägten CPE zeigten, wurde das Medium abgenommen, 1-2 ml 0% RPMI zugegeben und die Flaschen wurden bei -20°C eingefroren. Nach 24 h wurden die Zellen auf Eis aufgetaut, mit einem Zellschaber abgelöst, resuspendiert, die Zellen aus allen Flaschen gepoolt, mindestens 1 min gevortext und dreimal zentrifugiert (1000 x g, 15 min, 0°C), um die Zelldebris zu entfernen. Der Überstand, der die Viruspartikel enthält, wurde aliquotiert und bei -80°C weggefroren. Parallel wurden ebenfalls die Mockkontrollen aliquotiert.

3.2.2 Bestimmung der Titer mittels Endpunkttitration nach Spearman und Kärber

Um die Virustiter zu berechnen, wurde der TCID₅₀ (*tissue culture infectious dose 50%*) ermittelt, der die Verdünnung einer virushaltigen Lösung angibt, die ausreicht, um die Hälfte einer Zellkultur zu infizieren. Für die Endpunkttitration wurden je 5×10^4 B95a-Zellen / 100 µl in einen Napf einer 96-Napf-Platte (*half area*) ausgesät. Am nächsten Tag, wenn die Zellen zu 80% dicht waren, wurde eine logarithmische Verdünnungsserie (1:10) der zu titrierenden Viruspräparation in 0% RPMI vorbereitet und 8 Näpfe wurden mit jeder Verdünnungsstufe je 100 µl infiziert. Nach 1-2 h Inkubation bei 37°C wurde das Inokulum abgesaugt und gegen 100 µl frisches 5% RPMI gewechselt. 3 und 5 Tage p.I. wurden die Näpfe auf das Auftreten nach CPEs hin im Lichtmikroskop untersucht. Wenn MV IC323GFP titriert wurde, wurden die Näpfe auf grünfluoreszierende CPEs im Fluoreszenzmikroskop hin untersucht. Über die Anzahl der Näpfe mit CPEs wurde der TCID₅₀ mithilfe folgender Formel berechnet, die von Spearman und Kärber beschrieben wurde (Formel 3-1 und Formel 3-2) (Kärber, 1931; Spearman, 1908).

Methoden

$$\log TCID50 = x_{p=1} + \frac{1}{2}d - d \sum p$$

Formel 3-1: Formel zur Bestimmung der 50% Endpunkttitration. $x_{p=1}$ = dekadischer Logarithmus der höchsten Verdünnungsstufe, bei der noch zu allen Ansätzen ein CPE sichtbar ist, d = dekadischer Logarithmus des Verdünnungsfaktors, p = Anteil an CPE positiven Nöpfen pro Verdünnungsstufe, $\sum p$ = Summe aller p ab der Verdünnungsstufe $x_{p=1}$ und den p -Werten aller höheren Verdünnungen mit beobachteten CPE. Berechnet wird der dekadische Logarithmus der Verdünnungsstufe, bei der 50% der Ansätze einen CPE aufweisen.

$$SE \log TCID50 = \sqrt{d^2 \sum \frac{p(1-p)}{n-1}}$$

Formel 3-2: Formel zur Berechnung des Standardfehlers $TCID_{50}$. d = dekadischer Logarithmus der Verdünnungsstufe, p = Anteil an CPE positiven Nöpfen pro Verdünnungsstufe, n = Anzahl der Nöpfe pro Verdünnungsstufe.

3.2.3 MV-Infektion adhärenter und semiadhärenter Zelllinien

Einen Tag vor der Infektion wurden Vero, Vero SLAM, HeLa oder B95a Zellen in 6- oder 24-Napf-Platten ausgesät. Am nächsten Tag, wenn die Zellen 70% konfluent waren, wurde das Medium entfernt und die Mock oder Viruspräparation in vorgewärmtem 0% RPMI verdünnt, in die Nöpfe pipettiert und für 1-2 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde das Inkulum abgenommen und vorgewärmtes 10% oder 5% RPMI, entsprechend der Zelllinie, mit FIP (200 mM) versetzt und zu den Zellen gegeben um Zell-Zell-Fusionen zu inhibieren [125]. Nach 24 oder 48 h Kultivierung der Zellen im Inkubator wurden die Zellen für weitere Versuche verwendet. Um die Infektionsrate zu bestimmen wurde ein Aliquot MV WTF infizierter Zellen mit MV-Protein z.B. N- oder H-Protein spezifischen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert.

3.2.4 MV-Infektion von Suspensionszellen

Zuerst wurde die Zellzahl bestimmt und die entsprechende Anzahl an Zellen zentrifugiert (300 x g, 5 min, RT). Die Zellen wurden in vorgewärmten 0% RPMI resuspendiert, die entweder Mock- oder Viruspräparationen enthielt. Die Infektion von Suspensionszellen fand in einem 15 ml Falcon-Röhrchen statt. Nach 1-2 h im Inkubator bei 37°C wurden die Zellen gewaschen und in vorgewärmten 10 % RPMI (+FIP) resuspendiert. Die Zellen wurden in eine 6-Napfplatte transferiert und T-Zellen mit einer Zelldichte von 3×10^6 / ml kultiviert.

Methoden

3.2.5 MV-Beladung (*trans*-MV-DCs) und Infektion von DCs (*cis*-MV-DCs)

Trans-MV-DCs sind virusbeladene Zellen, die nicht produktiv infiziert sind. Dafür wurden DCs 2 h bei 37°C mit MV inkubiert [20], gewaschen und in Zytokinen (500 U/ml GM-CSF und 250 U/ml IL-4)-supplementierten 10% RPMI (+FIP) resuspendiert und sofort für weitere Experimente verwendet. Um MV-infizierte DCs zu erhalten, wurden die entsprechende Zellzahl von DCs mit MV für 2 h in 0% RPMI (+GM-CSF, IL-4) in 6 Napfplatten infiziert. Nach 1-2 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gewaschen (300 x g, 5min, RT) und in vorgewärmten 10% RPMI (+FIP, GM-CSF und IL-4) resuspendiert. Die infizierten DCs wurden mit einer Zelldichte von 0.5×10^6 / ml kultiviert. 24 h p.I. wurde die Infektionsrate im Durchflusszytometer bestimmt und die Zellen für Experimente verwendet.

3.2.6 MV-Transmission von *trans*-MV-DC oder *cis*-MV-DCs an T-Zellen

Für die Transmissionsexperimente wurden DCs entweder mit MV IC323-GFP beladen oder für 24 h infiziert. 5×10^4 DCs wurden mit 2×10^5 T-Zellen (entweder unstimuliert, P/I- oder α CD3/28-stimuliert) im Verhältnis 1:4 gemischt, abzentrifugiert (Tischzentrifuge 8.000 rpm, 1 min, RT) und in 100 μ l vorgewärmten, zytokinsupplementiertem 10% RPMI resuspendiert. Sollte die Blockierungseffizienz eines Antikörpers überprüft werden, wurden entweder DCs oder T-Zellen mit dem spezifischen oder dem entsprechenden Isotyp-Antikörper für 1 h bei 37°C vorinkubiert, anschließend gewaschen und dann die Ko-Kulturen in 100 μ l 10% RPMI (GM-CSF, IL-4) aufgenommen. Nach 2 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen gewaschen, in 500 μ l 10% RPMI (+FIP, GM-CSF, IL-4) resuspendiert, in einem Napf einer 48-Napfplatte für 3 Tage kultiviert, in ein FACS-Röhrchen überführt und mit 4 % PFA fixiert. Um DCs und T-Zellen im Durchflusszytometer zu unterscheiden, wurden die Zellen mit einem CD3-spezifischen, PE-konjugierten Antikörper gefärbt. Die Frequenz infizierter CD3⁺ T-Zellen wurde über die GFP-Expression bestimmt. Dafür wurden die T-Zellen entsprechend ihrer Zellgröße und -dichte im FSC/SSC-Blot und CD3^{hoch} Expression-Blot eingegrenzt.

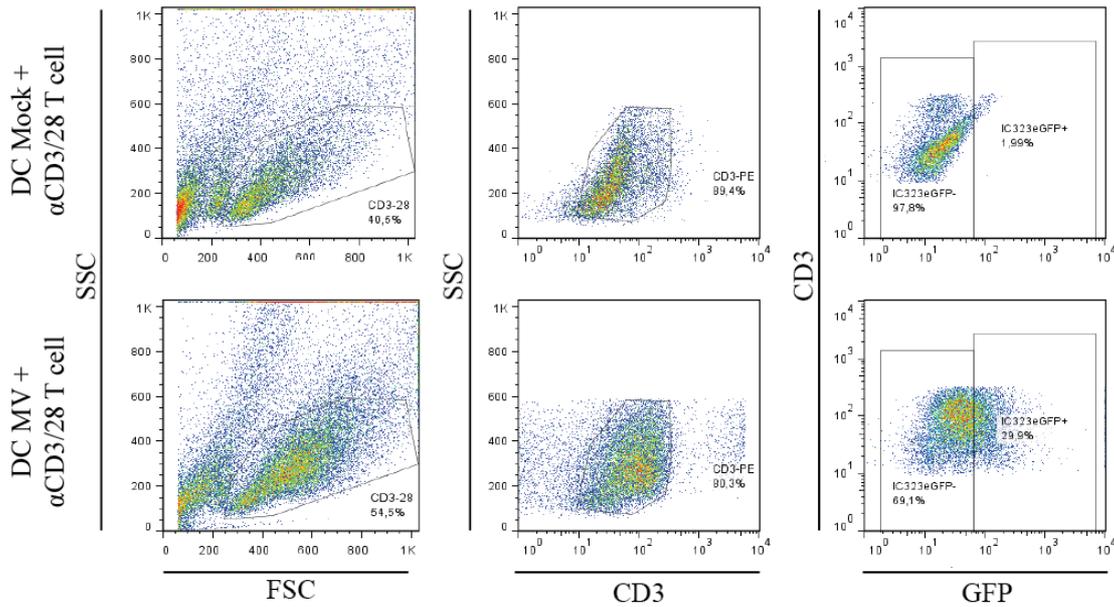


Abb. 3-2: FACS-Strategie zur Bestimmung der Frequenz $CD3^+/GFP^+$ T-Zellen 3 Tage nach der Transmission. Ein repräsentatives Beispiel wird gezeigt.

3.2.7 Virustitration zur Analyse der Produktion infektiöser viraler Partikel von MV-DCs und MV-B95a Zellen

B95a-Zellen und DCs wurden gezählt und 1.5×10^6 Zellen wurden für jeden Zeitpunkt eingesetzt. Die Zellen wurden sowohl mit Mock als auch mit MV WTF (MOI 1) in 1 ml 0% RPMI infiziert. Nach 2 h wurden die Zellen gewaschen und DCs in 2 ml 10% RPMI (+FIP, GM-CSF und IL-4) und B95a-Zellen in 2 ml 5% RPMI (+FIP) resuspendiert. 24 und 48 h p.I. wurden die Zellen und die Überstände wie folgt gesammelt. Die Zellen wurden mit einem Zellschaber abgelöst, im Medium resuspendiert und zentrifugiert um die Zellen vom Überstand zu separieren ($300 \times g$, 5 min, RT). Die Zellen wurden mit PBS-/- gewaschen und in 2 ml 0% RPMI resuspendiert. Ein Aliquot wurde für die Bestimmung der Infektionsrate mittels Durchflusszytometer zurückgehalten. Der Überstand wurde nochmals zentrifugiert, um Zelldebris zu entfernen ($1.000 \times g$, 15 min, $0^\circ C$). Die Zellen und der Überstand wurden bis zur Titration auf $-80^\circ C$ eingefroren. Um zellassoziiertes Virus zu ernten wurden die aufgetaute Zellsuspension mehrfach gevortext, in einer Tischzentrifuge (8.000 rpm, 10 min, $4^\circ C$) pelletiert und der Überstand gesammelt. Für die Titration wurden Verdünnungsstufen 1:4 und 1:5 in 0% RPMI hergestellt und je 100 μl auf die B95a-Zellen pipettiert. Die Anzahl von CPE

Methoden

wurde am Tag 3 und 5 nach der Titration ausgezählt und die $TCID_{50}$ wurde mithilfe der Formel ermittelt, die von Spearman und Kärber beschrieben wurde.

3.3 Molekularbiologische Methoden

3.3.1 Hitzeschock-Transformation von kompetenten Bakterien

Kompetente Top10 Bakterien (Invitrogen) wurden auf Eis aufgetaut. 50 ng Plasmid-DNA (verdünnt in TE-Puffer) wurden mit den Bakterien durch leichtes Klopfen an das Röhrchen gemischt und für 5 min bei 37°C im Heizblock inkubiert. Danach wurde das Bakterienröhrchen vom Heizblock auf Eis transferiert und 5 min gekühlt. 1 ml vorgewärmtes LB-Medium wurde zugegeben und 15 min bei Raumtemperatur inkubiert. Das Bakterienröhrchen wurde für 100 min bei 37°C und 225 rpm geschüttelt. Anschließend wurden 50 – 100 µl der Bakteriensuspension auf LB-Selektionsagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei 37°C inkubiert. Am nächsten Tag wurden Bakterienklone gepickt und in 2 ml LB-Selektionsmedium über Nacht bei 225 rpm und 37°C geschüttelt.

3.3.2 Glycerol-Bakterienstocks

900 µl der Bakterienkultur wurden mit 100 µl Glycerol gemischt. Die Glycerol-Bakterienstocks wurden langsam heruntergekühlt, zuerst bei -20°C eingefroren und nach einigen Stunden auf -80°C transferiert.

3.3.3 Plasmid-DNA Präparation

Um Plasmid-DNA aus transformierten Bakterien aufzureinigen, wurden abhängig vom Volumen der Bakterienkultur die Mini-Präparation (3 ml Bakterienkultur) oder das *EndoFree*® Plasmid Maxi Kit (100 ml Bakterienkultur) dem Protokoll folgend verwendet. Die aufgereinigte Plasmid-DNA wurde für Transfektionsexperimente verwendet.

Methoden

3.3.4 Photometrische Bestimmung der DNA-Konzentration

Zur Bestimmung der DNA-Konzentration wurde die Absorption der DNA-Lösung bei 260 nm mit dem Eppendorf BioPhotometer gemessen. Dafür wurde die DNA-Lösung 1:100 in H₂O verdünnt. Um die DNA-Konzentration zu berechnen wurde folgende Formel benutzt:

$$c[\text{ng} / \text{ml}] = OD_{260} \times V \times F$$

Formel 3-3: Formel zur Bestimmung der DNA-Konzentration. V = Verdünnungsfaktor, F = Multiplikationsfaktor (für doppelsträngige DNA = 50)

3.3.5 Agarose-Gelelektrophorese

Um die Größe und Reinheit der aufgereinigten Plasmid-DNA zu untersuchen wurde 1 µg aufgereinigte Plasmid-DNA auf ein 1%-TAE-Agarosegel geladen und mit 5 µl Ethidiumbromid / 50 ml TAE-Agarosegel-Lösung versetzt. Bei UV-Licht (280 nm) Anregung emittiert Ethidiumbromid detektierbare Fluoreszenz. 5 Volumen Plasmid-DNA wurden mit einem Volumen 6x Ladepuffer gemischt und in die Taschen des Agarosegels geladen. Um die Größe der Plasmid-DNA zu bestimmen, wurde zusätzlich 5 µl DNA-Marker in die Geltaschen pipettiert. Die elektrophoretische Separation erfolgte bei 90 V in 1 x TAE-Puffer. Die DNA wurde mit Hilfe des UV-Licht visualisiert.

3.4 Transfektion

3.4.1 Transfektion von HeLa-Zellen mit PEI

Einen Tag vor der Transfektion wurden 2 x 10⁵ HeLa Zellen / Napf in eine 6-Napfplatte ausgesät, so dass sie am nächsten Tag zu 70% konfluent waren. 3 µg Plasmid-DNA und 6 µl Polyethylenimide (PEI, biomol) wurden jeweils in 100 µl 150 mM NaCl₂ verdünnt. Die PEI-Lösung wurde zur DNA-Lösung pipettiert, gevortext und für 30 min bei Raumtemperatur inkubiert. Währenddessen wurde das Medium der HeLa-Zellen gewechselt und 1 ml 5%

Methoden

MEM zugegeben. Der DNA / PEI-Mix wurde tropfenweise zu den HeLa-Zellen pipettiert, durch leichtes Kreisen der Platte verteilt und für mindestens 3 h bei 37°C inkubiert. Anschließend wurde frisches Medium zugegeben und am nächsten Tag wurde das Medium komplett gewechselt. Die Transfektionsrate wurde abhängig von den geplanten Experimenten gewöhnlich nach 24 oder 48 h bestimmt.

3.4.2 Transfektion von T-Zellen (Amaxa®)

Um unstimulierte T-Zellen zu transfizieren wurde das Amaxa® Human T cell nucleofector® kit (Lonzo) verwendet. Dafür wurden 10×10^6 T-Zellen mit PBS-/- gewaschen und der Überstand komplett abgenommen. Das Zellpellet wurde in 100 µl Nucleofector®-Lösung (82 µl Nucleofector® *solution* wurde mit 18 µl *supplement solution* gemischt) pro Ansatz resuspendiert. Der Zellsuspension wurde 5 µg Plasmid-DNA zugefügt und in eine Küvette transferiert. Das Programm U-014 wurde für die Transfektion verwendet. 500 µl vorgewärmtes 10% RPMI wurde direkt nach dem elektrischen Impuls zugegeben. Die Zellen wurden in einen Napf einer 12-Napfplatte transferiert, in den 1.5 ml 10% RPMI vorgelegt wurden war. Die Transfektionsrate wurde nach 24 h im Durchflusszytometer bestimmt.

3.5 Durchflusszytometer / *Fluorescence-activated cell sorter* (FACS)

Alle Proben wurden im FACS Calibur™, Becton Dickinson analysiert. Die erhaltenen Daten wurden entweder mithilfe der CellQuest Pro Software oder der FlowJo Software ausgewertet.

3.5.1 Fixierung

Wenn nicht anders angegeben, wurden fixierte Zellen für die Analyse im Durchflusszytometer verwendet. Dafür wurden die Zellen geerntet und in PBS-/- gewaschen. Für Oberflächenfärbungen wurden die Zellen in einer 2% PFA-Lösung für 12 min auf Eis fixiert. Zellen, die intrazellulär gefärbt werden sollten, wurden mit 4 % PFA für 12 min auf Eis fixiert. Nach der Fixierung wurden die Zellen in PBS-/- gewaschen und entweder direkt gefärbt oder bis zur Färbung im Kühlschrank gelagert.

Methoden

3.5.2 Oberflächenfärbung (FACS)

Der Antikörper wurde in 50 µl FACS-Puffer pro Ansatz verdünnt und für 30 min auf Eis auf die Zellen gegeben (mindestens 1×10^4 Zellen pro Ansatz). Die Zellen wurden mehrmals mit 1 ml PBS-/- gewaschen. War der Primärantikörper nicht direkt mit einem Fluorochrom konjugiert, wurde der entsprechende Sekundärantikörper ebenfalls in 50 µl FACS-Puffer pro Ansatz verdünnt, auf die Zellen gegeben und für 30 min inkubiert. Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Eine entsprechende Isotyp-Kontrolle wurde mitgeführt.

3.5.3 Intrazelluläre Färbung (FACS)

Der jeweilige Primärantikörper wurde in 50 µl Saponinpuffer (0.5%) verdünnt und für 30-60 min bei Raumtemperatur im Dunkeln auf die Zellen (mindestens 1×10^4 Zellen pro Ansatz) gegeben. Anschließend wurden die Zellen mehrfach mit 1 ml PBS-/- gewaschen. War der Primärantikörper nicht direkt mit einem Fluorochrom markiert, wurde der entsprechende Sekundärantikörper ebenfalls in 50 µl Saponinpuffer pro Ansatz verdünnt, auf die Zellen gegeben und für 30 min inkubiert. Für die Analyse im Durchflusszytometer wurden die Zellen in 100 µl FACS-Puffer aufgenommen. Eine entsprechende Isotyp-Kontrolle wurde mitgeführt.

3.6 Immunfluoreszenzmikroskopie

3.6.1 Aussäen der DCs auf PLL-beschichteten *chamber slides*

Die *chamber slides* wurden mit poly-L-lysine (0.01 % in H₂O, Sigma) für 10 min bei Raumtemperatur beschichtet. Anschließend wurden die Objektträger dreimal mit PBS-/- gewaschen und über den Luftstrom der Arbeitsbank getrocknet. 2×10^5 DCs wurden in 100 µl 10% RPMI (+FIP, GM-CSF, IL-4) resuspendiert und in eine Kammer des Objektträgers pipettiert. Damit die Zellen adhären, wurden sie für 5 min bei 4°C inkubiert und danach für 30 min zu 37°C transferiert. Die Zellen wurden mit 2% PFA für 12 min fixiert. Um PFA vollständig zu

Methoden

entfernen, wurden die Zellen mehrfach mit PBS-/- gewaschen und für späteren Anwendungen auf 4°C gelagert.

3.6.2 Bildung von autologen DC / T-Zell-Konjugaten auf *chamber slides*

Vor dem Aussäen der Mock-DCs wurden die Zellen mit AlexaFluor 488 konjugiertem WGA (*wheat germ agglutinin*) (verdünnt 1:400 in 1% BSA/PBS-/-) für 15 min auf Eis markiert und anschließend gewaschen. 5×10^4 DCs wurden in 100 μ l 10% RPMI (+FIP, GM-CSF, IL-4) resuspendiert und in eine Kammer ausgesät. Zum Adhären werden die DCs bei 4°C für 5 min inkubiert und danach für 20 min zu 37°C gewechselt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und 2×10^5 T-Zellen, die in 10% RPMI (+GM-CSF, IL-4) resuspendiert wurden, wurden zu den DCs pipettiert. Die Konjugatbildung erfolgte für 60 min bei 37°C. Die Konjugate wurden mit 2% PFA für 12 min fixiert, mehrmals mit PBS gewaschen und bei 4°C gelagert.

3.6.3 Aussaat von semiadhärenten und adhären Zelllinien auf Deckgläsern

1.5×10^5 B95a-Zellen, die in 5% RPMI und 7.5×10^4 HeLa-Zellen, die in 5% MEM resuspendiert wurden, wurden auf Deckgläsern in einem Napf einer 24-Napfplatte ausgesät und über Nacht im Inkubator bei 37°C kultiviert.

3.6.4 Oberflächenfärbung (IF)

Fixierte Zellen wurden mit 5% BSA für 20 min bei RT inkubiert, um unspezifische Bindungsstellen zu blockieren. Der Primärantikörper wurde in 1% BSA / PBS-/- verdünnt, auf die Zellen pipettiert und für 1 h bei 37°C inkubiert. Ungebundener Antikörper wurde durch mehrmaliges Waschen mit PBS-/- entfernt. Der Sekundärantikörper wurde ebenfalls in 1% BSA / PBS-/- verdünnt, 1 h bei 37°C auf den Zellen inkubiert und anschließend wurde nicht gebundener AK mehrmals mit PBS-/- gewaschen. Danach wurden die Zellen mit Fluoromount und einem Objektglas eingedeckelt.

Methoden

3.6.5 Intrazelluläre Färbung (IF)

Fixierte Zellen wurden zuerst mit 0.05% Tween / PBS-/- für 20 min bei RT permeabilisiert. Die Objektträger wurden danach mehrmals mit PBS-/- gewaschen und dem Protokoll für Oberflächenfärbungen folgend zuerst mit 5% BSA inkubiert. Anschließend wurden die Zellen mit dem Primär- und später mit dem Sekundärantikörper gefärbt und schließlich mit Fluoromount und einem Objektglas eingedeckelt.

3.6.6 Zenon® labelling kit

Mithilfe des Zenon® *labelling kits* wurden primäre Antikörper an ihrer Fc-Region mit Fluorophor-konjugierten Fab-Fragmenten markiert. Dafür wurden 1 µg IgG1-Ak mit 5 µl des Komponenten A (Fluorophor-konjugiertes Fab-Fragment) für 5 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Danach wurden 5 µl Komponente B hinzu pipettiert und ebenfalls für 5 min bei RT in Dunkelheit inkubiert. Der Antikörper wurde in 1% BSA / PBS-/- entsprechend verdünnt und für 1 h bei 37°C auf den Zellen inkubiert, die anschließend mehrmals mit PBS -/- gewaschen wurden.

3.6.7 HRP-Färbung

Die membranimpermeable *horse-radish peroxidase* (HRP) wurde verwendet, um dem extrazellulären Milieu zugängliche Kompartimente zu visualisieren. 24 h p.I. wurden MV-DCs auf PLL-beschichteten Objektträger ausgesät. Nach 1 h Inkubation bei 37°C wurden die Zellen auf Eis transferiert und für 20-30 min gekühlt. Danach wurde die Zellen mit HRP-versetzten 10% RPMI (+FIP, GM-CSF und IL-4) (10 mg/ml, HRP type II, SIGMA) für 1 h auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden mehrmals mit PBS -/- gewaschen und fixiert. Um das gebundene HRP zu detektieren, wurden die DCs mit einem HRP-spezifischen Antikörper für 1 h bei 37°C und danach mit einem entsprechenden Sekundärantikörper gefärbt [119]. Anschließend wurden die Objektträger mit Fluoromount und einem Objektglas eingedeckelt.

Methoden

3.6.8 Färbung des Zellkerns

Für die Färbung des Zellkerns wurde entweder DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) oder DRAQ 5 in 1% BSA / PBS-/- verdünnt, auf die Zellen pipettiert und für 5 bis 10 min auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen mehrmals mit PBS-/- gewaschen.

3.6.9 Kolokalisationsanalyse – WCIF Image J

Die Kolokalisationsanalyse wurde durchgeführt um das Ausmaß der Kolokalisation zweier Proteine in einer Zelle zu quantifizieren. Für die Auswertung wurde die Software WCIF Image J mit dem Plugin Kolokalisation verwendet. Für die Analyse wurden die Fluoreszenzsignale gesplittet und der Kolokalisationskoeffizient (R_r) wurde mithilfe des Pearson's Algorithmus, der von -1 bis +1 reicht, berechnet. Mindestens 10, meistens jedoch 20-30 verschiedene IF-Aufnahmen wurden pro Färbung analysiert. Der Mittelwert aller Kolokalisationskoeffizienten einer Färbung wurde errechnet. Werte zwischen 0.5 und 0.7 wurden als partielle Kolokalisation definiert und Werte über 0.7 repräsentieren eine prominente Kolokalisation zweier Proteine.

3.6.10 Proteinlokalisationsanalyse in DC / T-Zell-Konjugaten

Die IF-Aufnahme wurde mithilfe von Image J in die einzelnen Fluoreszenzkanäle gesplittet. Das erhaltene Schwarz/Weiß-Image wurde exportiert und mit der Software AIDA Image Analyzer geöffnet. Um die Verteilung eines Proteins in der VS zu untersuchen, wurden die Gesamtpixelintensität (100%) und die Pixelintensität in der VS bestimmt. Die Quantifizierung berechnete prozentuale Akkumulation in der VS im Vergleich zur Gesamtpixelintensität des zu untersuchenden Proteins. Es wurden mindestens 20 Konjugate pro Färbung analysiert und der Mittelwert der prozentualen Akkumulation aller Konjugate einer Färbung berechnet.

Methoden

3.7 Biarsenical dye – fluorescein arsenical hairpin binder (FAsH)

Zumeist wird ein zu untersuchendes Protein mit dem grün-fluoreszierenden Protein (*green fluorescent protein*, GFP) oder einer seiner Farbvarianten fusioniert, die relativ groß sind (~ 27 kDa) und somit die Expression, zelluläre Lokalisation oder Funktion des Fusionsproteins modifizieren können. Der Tetracystein (TC)-Tag ist sehr kurz und erlaubt die Analyse der Lokalisierung und Bewegung von Proteinen in lebenden Zellen [126]. Kleine membranpermeable Fluorophore binden an Aminosäure-Sequenzen, wie z.B. der fluorogene Biarsenical dye – FAsH, eine vom Fluoreszenzfarbstoff Fluorescein abgeleitete arsenhaltige chemische Verbindung, die kovalent und spezifisch an kurze Peptidsequenzen, dem TC-Tag, bindet. Im Komplex mit Ethandithiol (EDT) FAsH-EDT₂ wird aus dem nicht-fluoreszierenden FAsH ein Fluoreszenzfarbstoff. Erste Experimente führten zu der Beschreibung der minimalen Bindungssequenz CCPGCC, die aus vier Cysteinen und einem aus zwei Aminosäuren bestehenden Spacer aufgebaut ist [127]. Um die Hintergrundfluoreszenz zu minimieren, wurden die flankierenden Sequenzen optimiert und die Sequenzen, die aus 12 Aminosäuren aufgebaut sind, publiziert - FLNCCPGCCMEP und HRWCCPGCCKTF [128]. Neben dem fluoreszierenden FAsH können Proteine auch mit dem rot-fluoreszierendes Analog *resorufin arsenical hairpin binder* (ReAsH) gelabelt werden.

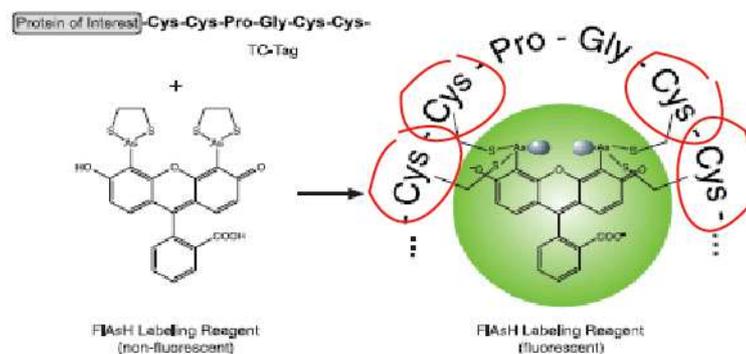


Abb. 1-6: Bindung von FAsH an das TC-Motiv (modifizierte Abbildung von www.invitrogen.com)

3.7.1 FAsH & ReAsH-Markierung

Zellen, die entweder transient nach Transfektion (Plasmide: pCG-M323-TC 6aa, pCG-M323 FAsH 12aa, pCG-M ED-TC 6aa or pCG-M ED FAsH 12aa, Plasmidtable 2-3) oder Infektion mit rekombinantem MV (rMV323 M-TC 12aa oder rMV ED M-TC 12aa (MV Tabelle 2-

Methoden

2)), das M-TC Fusionsprotein exprimierten, wurden 24 oder 48 h nach der Transfektion oder Infektion entweder mit FIAsh oder ReAsH Reagenzien markiert. Das Protokoll für die FIAsh- bzw. ReAsH-Färbung wurde von Dr. Carsten Hoffman (Institut für Pharmakologie und Toxiologie / Würzburg) zur Verfügung gestellt und für die Markierung von DCs modifiziert [126, 129]. 25 mM Ethandithiol (EDT)-Lösung wurde frisch hergestellt. Dafür wurde 1.05 µl EDT mit 500 µl DMSO versetzt. 1 µl FIAsh wurde mit 1 µl 25 mM EDT gemischt und für 10 min bei RT inkubiert. Der FIAsh / EDT-Mix wurde in 200 µl FIAsh / ReAsH Markierungspuffer verdünnt und in 10 min bei RT inkubiert. Währenddessen wurden die Zellen einmal mit FIAsh / ReAsH Markierungspuffer gewaschen, der dann komplett abgenommen wurde. Anschließend wurde der FIAsh / EDT-Mix auf die Zellen pipettiert und für 1 h 37°C inkubiert. Um den Waschpuffer vorzubereiten, wurde 21 µl EDT (500 mM EDT) mit 500 µl DMSO versetzt. 5 µl EDT / DMSO-Mix wurde in 10 ml FIAsh / ReAsH-Markierungspuffer verdünnt, so dass eine 250 mM EDT-Waschlösung entstand. Nach 1 h wurde das FIAsh-Medium komplett abgenommen und 1 ml Waschlösung wurde zugegeben. Nach 10 min Inkubation bei 37°C wurde die Waschlösung abgenommen und die Zellen wurden nochmals für 10 min mit 1 ml Waschlösung gewaschen. Danach wurden die lebenden Zellen im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Zur Markierung des M-TC Protein mit ReAsH, wurde 2.5 µl 2 mM ReAsH mit 0.5 µl 25 mM EDT in DMSO verdünnt (2.1 µl 10 M EDT in 1 ml DMSO) und für 10 min bei RT inkubiert. 1 ml FIAsh / ReAsH-Markierungspuffer wurde hinzugefügt und nochmals für 10 min inkubiert. Vor der Markierung wurden die Zellen einmal mit FIAsh / ReAsH-Markierungspuffer gewaschen und der ReAsH-Mix für 1 h bei 37°C inkubiert. 250 µl BAL (25 mM Stocklösung) wurde im FIAsh / ReAsH-Markierungspuffer verdünnt, um den ReAsH-Waschpuffer herzustellen. Die Zellen wurden zweimal mit je 1 ml ReAsH-Waschpuffer für 10 min gewaschen. Im Anschluss wurden die Zellen sofort im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

3.8 Proteinbiochemie

3.8.1 Präparation von Zelllysaten

Die Zellen wurden gezählt und mit PBS-/- gewaschen. Je 1×10^6 Zellen wurden in 100 μ l NP-40 Lysepuffer, dem 2 μ l Proteaseinhibitor-Cocktail hinzugefügt wurde, resuspendiert, mehrmals gevortext und für 30 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Lysat in der Tischzentrifuge zentrifugiert (13.000 rpm, 15 min, 4°C) um die Zelldebris zu pelletieren. Der Lysatüberstand wurde abgenommen und bei -20°C eingefroren.

3.8.2 Photometrische Bestimmung der Proteinkonzentration mittels Bicinchoninsäure (BCA)-Assay

995 μ l Bicinchoninsäurelösung (Kupfer(II)sulfat-Lösung 1:50 verdünnt in Bicinchoninsäure) wurden mit 5 μ l des Proteinlysates gemischt und für 15 min bei 60°C inkubiert. Eine Proteinlösung der Konzentration von 1 mg/ml wurde als Standard verwendet. Als Blank-Kontrolle wurde Kupfer(II)sulfat / Bicinchoninsäure-Lösung verwendet. Die Proteinkonzentration wurde mithilfe des Programms BCA im Photometer gemessen.

3.8.3 Fraktionierung Detergenzresistenter Membranfraktionen (DRM)

Um die Assoziation des viralen M-Proteins mit DRMs zu analysieren, wurden MV-infizierte oder pCG-M transfizierte Zellen mit PBS-/- gewaschen. Das Zellpellet wurde in 200 μ l Brij 98-Lysepuffer, das mit 1 mM NaF ergänzt wurde, resuspendiert, mehrmals gevortext und für 20 min auf Eis inkubiert. Anschließend wurde das Zelllysate mit 600 μ l 60 % Saccharose-Lösung (in NTE) versetzt und in ein 4 ml Ultrazentrifugenröhrchen vorgelegt. Nacheinander wurde das Lysat mit 2.5 ml 30 % und abschließend mit 2.5 % Saccharose-Lösung vorsichtig überschichtet. Die Dichtegradientenzentrifugation erfolgte bei 350.000 x g für 16 h bei 4°C. Am nächsten Tag wurde der Boden des Ultrazentrifugenröhrchens mit einer Kanüle perforiert und jeweils 500 μ l Fraktionen in 2 ml Reaktionsgefäßen gesammelt. Die Fraktionen wurden mit 1 ml eiskaltem Azeton versetzt, mehrmals invertiert und für mindestens 60 min bei -20°C eingefroren, um die Proteine zu präzipitieren. Nach der Zentrifugation (13.000 rpm, 20 min,

Methoden

4°C) wurde der Überstand vorsichtig abgenommen und das Präzipitat in 30 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert. Die Proben wurden mittels SDS-Gelelektrophorese und anschließendem Western Blot analysiert.

3.8.4 Viruspartikel- / *Virus like particle*-Freisetzungssassay

Nach 24 bzw. 48 h Infektion oder Transfektion wurden die Zellen und der Überstand geerntet. Die Überstände wurden zuerst niedrigtourig (3.000 x g, 15 min, 4°C) und dann durch ein 20% Saccharosekissen (500 µl in NTE) in einem Ultrazentrifugationsröhrchen ultrazentrifugiert (150.000 x g, 2 h, 4°C). Das Sediment wurde in 30 µl SDS-Probenpuffer resuspendiert und bis zur Analyse mittels SDS-Gelelektrophorese und Western Blot auf -80°C eingefroren. Die Zellen wurden mit NP-40-Lysepuffer lysiert und dienten als Expressionskontrolle.

3.8.5 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-PAGE dient der Auftrennung von Proteinen entsprechend ihrer Größe im elektrischen Feld. Das Trenngel wurde zuerst zu 4/5 in eine Gelkammer gegossen und mit Isopropanol überlagert. Nachdem das Trenngel auspolymerisiert war, wurde Isopropanol abgenommen, das Trenngel wurde mit Sammelgel überschichtet und für die Taschen wurde ein Kamm in das Gel geschoben, bevor es vollständig auspolymerisiert war.

Trenngel

Konzentration von Acrylamid	10 %	12 %	15 %
1.5 M Tris-HCl, pH 8.7	8.0 ml	8.0 ml	8.0 ml
H ₂ O	12.9 ml	10.8 ml	7.2 ml
30 % Acrylamid	10.6 ml	12.8 ml	16.0 ml
10 % APS	280 µl	280 µl	280 µl
20 % SDS	160 µl	160 µl	160 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl

Methoden

Sammelgel	
1 M Tris-HCl, pH 6.8	1.25 ml
H ₂ O	6.0 ml
30 % Acrylamid	1.3 ml
10 % APS	100 µl
20 % SDS	50 µl
TEMED	10 µl

Die Gelkammer wurde mit SDS-Laufpuffer gefüllt. Die Proteinkonzentration der Proben wurde bestimmt und das entsprechende Volumen wurde mit 6x SDS-Probenladepuffer versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 100°C aufgeköcht, kurz anzentrifugiert und in die Gel-taschen geladen. Der Gellauf fand bei 10 mA über Nacht statt und wurde beendet, wenn die Lauffront 1 cm vor der unteren Plattenkante war.

3.8.6 Western-Blot-Analyse und Quantifizierung

Der Western Blot ermöglicht das Übertragen von Proteinen, die im Elektroblot aufgetrennt wurden, auf Nitrozellulosemembran. Die negativ-geladenen Proteine wandern dabei im elektrischen Feld zum positiv-geladenen Pol (Anode). Die Nitrozellulosemembran liegt zwischen Gel und Anode im Halbtrockenblot.

Zuerst wurden 6 Whatman-Papiere in der Größe des Gels zurechtgeschnitten. Die ersten 2 Papiere und das Gel wurden in den Kathodenpuffer getaucht. Die Nitrozellulosemembran wurde in 30 mM Anodenpuffer äquilibriert und auf das Gel gelegt. Danach folgten 2 Whatman-Papiere, die in 30 mM Anodenpuffer und schließlich 2 weitere Papiere, die in 300 mM Anodenpuffer äquilibriert wurden. Der gesamte Aufbau sollte luftblasenfrei erfolgen. Nach dem Schließen der Blotkammer wurden für 1 h 15 min bei 120 mA die Proteine transferiert.

Nach dem Blotten wurde die Nitrozellulose entnommen und zur Absättigung unspezifischer Bindungsstellen für 30 min in 10 % Milchlösung (10% Trockenmilchpulver in PBS / 0.5% Tween) auf einer Wippe inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit 0.5 % Tween (PBS-/-) für jeweils 10 min erfolgte ein Immunnachweis der Proteine auf der Nitrozellulosemembran mit spezifischen monoklonalen Primärantikörpern, die entweder für 1 h bei RT auf der Wippe inkubierten oder über Nacht bei 4°C. Die Membran wurde dreimal für 10 min mit 0.5 % Tween gewaschen. Der HRP-konjugierte Sekundärantikörper wurde in der Milchlösung ver-

Methoden

dünnt und für mindestens 1 h bei RT auf der Wippe inkubiert. Im Anschluss wurde die Membran nochmal dreimal für 10 min mit 0.5 % Tween gewaschen. Die Proteine wurden mithilfe der ECL-Reagenzien nachgewiesen. Dafür wurden beide Komponenten 1:2 gemischt. 2 ml ECL-Lösung wurden gleichmäßig auf die Membran pipettiert und für 1 min im Dunkeln inkubiert. Durch die enzymatische Aktivität der Peroxidase wird Luminol so umgesetzt, dass Licht produziert wird, dass zu einer Schwärzung des aufgelegten Röntgenfilms führt. Für Quantifizierungen wurden der Röntgenfilm eingescannt und digitalisiert und, wenn angegeben, mit dem AIDA Image Analyzer ausgewertet.

3.9 Statistische Analyse

Um statistische Signifikanz (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$) zu errechnen, wurde die GraphPad Prism Software verwendet. Für die Transmissionsexperimente mit mindestens 3 verschiedenen Ansätzen wurde *one-way* ANOVA gefolgt von dem Bonferroni *post-testing* verwendet. Für die Analyse der Umverteilung von Molekülen zur Synapse wurde der Student's t-Test verwendet.

4 Ergebnisse

DCs sind relativ unfähig, infektiöse virale Partikel zu produzieren, obwohl virale Transkripte akkumulieren. Im Folgenden sollte die MV-Infektion humaner unreifer DCs (iDCs) im Vergleich zu infizierten B95a-Zellen untersucht werden. Dabei wurde im Besonderen die intrazelluläre Verteilung des M-Proteins verglichen. Durch die Verminderung der Partikelproduktion in DCs wird eine spezielle MV-Transmissionsstruktur für die Infektion von T-Zellen benötigt, damit effizient Virus übertragen werden kann. Die MV-Transmission von infizierten DCs an autologe T-Zellen wurde analysiert, wobei die Analyse der Architektur der MV-induzierten Virologischen Synapse im Vordergrund stand.

4.1 MV-Infektion von DCs (MV-DCs)

4.1.1 Effizienz der MV-Infektion

Humane iDCs exprimieren nur geringe Mengen des MV-Eintrittsrezeptors CD150 auf der Oberfläche, jedoch hohe Mengen von DC-SIGN, welches MV-Bindung, aber nicht den Viruseintritt vermittelt [26]. Zuerst wurde die Oberflächenexpression von CD150 auf iDCs und LPS-ausgereiften DCs (mDCs) analysiert. Die Messung der CD86-Expression diente als Ausreifungsmarker (Abb. 4-1). Sowohl CD86 als auch CD150 wurden auf der Oberfläche von mDCs heraufreguliert. Die CD150-Expression war auf mDCs um das 2.3-fache im Vergleich zu iDCs erhöht.

Ergebnisse

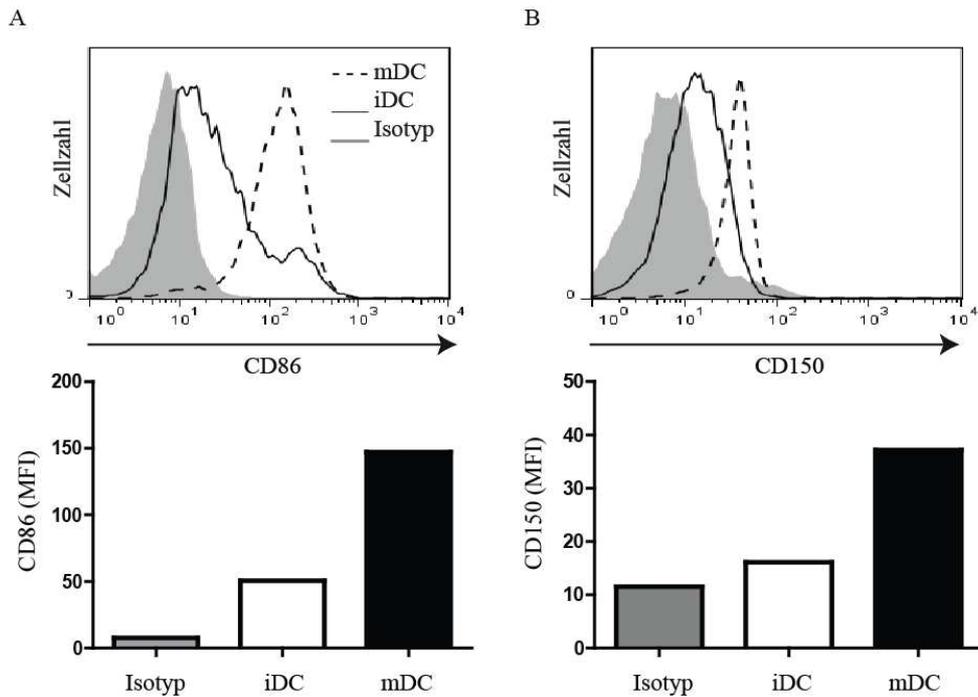


Abb. 4-1: CD86- und CD150-Oberflächenexpression auf iDCs und mDCs. iDCs wurden für 24 h mit LPS (100 ng/ml) zu mDCs ausgereift. Die Expressionsniveaus von CD86 und CD150 auf der Oberfläche von iDCs und mDCs wurden im Durchflusszytometer bestimmt.

Um *in vitro* die iDC Infektionseffizienz zu testen, wurden diese entweder mit dem MV-Wildtypstamm WTF oder mit dem rekombinanten Stamm IC323 infiziert. Um die Infektion im Durchflusszytometer oder in der konfokalen Immunfluoreszenzmikroskopie visualisieren zu können, wurden die rekombinanten IC323-Stämme verwendet, die von einem japanischen Wildtyp-Stamm generiert wurden und entweder GFP (MV IC323-GFP) oder *tomato red* (MV IC323-*tomato red*) in einem zusätzlichen offenen Leserahmen oberhalb des N-Gens kodieren (Position 1) (Abb. 4-2) [130]. Die rekombinanten Stämme weisen weder Unterschiede in der Rezeptornutzung noch in der *in vitro* Replikation auf. Die infizierten Zellen produzieren entweder hohe Mengen an GFP oder *tomato red*, die als Reporterproteine für die MV-Infektion dienen. Die Konzentration von GFP bzw. *tomato red* ist ein direktes Maß für das Niveau der MV-Replikation.



Abb. 4-2: Schematische Darstellung des Genoms von dem rekombinanten MV IC323-*tomato red*-Stamm. MV IC323-GFP exprimiert anstatt des *tomato red*-Proteins GFP an Position 1.

Ergebnisse

iDCs oder LPS-ausgereifte DCs (mDCs) wurden entweder mit MV IC323-*tomato red* (MOI 1) oder Mock (Kontrolle) für 24 und 48 h infiziert und das Expressionsniveau des Reporterproteins wurden mittels Durchflusszytometrie oder Fluoreszenzmikroskopie analysiert.

24 h nach Infektion (*post-infection*, p.I.) konnten bereits *tomato red* – exprimierende iDCs und mDCs detektiert werden, jedoch keine *tomato red*⁺-DCs in der Mock-behandelten Population (Abb. 4-3 A, weißer Pfeil). Mithilfe des Durchflusszytometers wurde die Frequenz infizierter DCs gemessen. 24 h p.I. waren 12 % der iDCs und 16 % der mDCs infiziert. Nach 48 h stieg die Zahl der infizierten Zellen trotz FIP-Zugabe etwas an - 21 % *tomato red*⁺ iDCs und 20 % infizierte mDCs wurden detektiert. Allerdings waren die Expressionsniveaus des Reporterproteins *tomato red* unterschiedlich. Die mittlere Fluoreszenzintensität (MFI) war deutlich höher in iDCs als in mDCs. 24 h p.I. betrug die MFI für iDCs 104 und für mDCs 16. Das bedeutet, dass die Expression des *tomato red*-Proteins 6-mal höher in infizierten iDCs und nach 48 h Infektion weiterhin 4-mal höher war als in mDCs (Abb. 4-3 B).

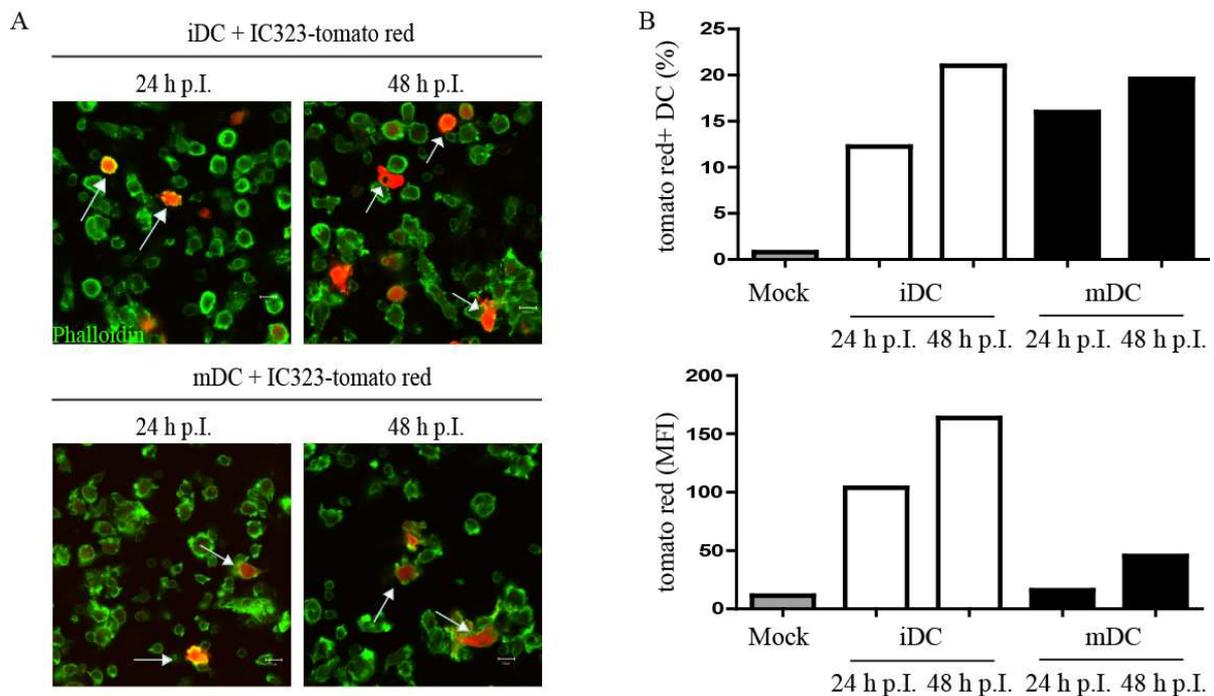


Abb. 4-3: MV IC323-*tomato red* Infektion von iDCs und mDCs. iDCs und mDCs wurden 2 h mit IC323-*tomato red* bzw. Mock-infiziert und danach in FIP-haltigem Medium kultiviert. Die Analyse *tomato red*⁺ DCs erfolgte 24 und 48 h p.I. (A) im Fluoreszenzmikroskop oder (B) im Durchflusszytometer. Für die IF wurden DCs auf PLL-beschichteten Objektträgern ausgesät, fixiert und mit Phalloidin-A488 gefärbt, um die Zellgrenzen zu visualisieren. *tomato red*⁺ DCs wurden mit einem weißen Pfeil gekennzeichnet. MFI = mittlere Fluoreszenzintensität

Der MV-Eintritt schien trotz unterschiedlicher CD150 Oberflächen-Expressionsniveaus in iDCs und mDCs gleich zu sein. Allerdings war die Replikationseffizienz in iDCs deutlich höher.

Ergebnisse

4.1.2 DC-Ausreifung nach MV-Infektion

MV-Infektionen induzieren die Ausreifung von iDCs [94, 95], die charakterisiert ist durch die Hochregulierung von MHC I, MHC II, CD25, CD40, CD69, CD80, CD83 und CD86. CD150 ist ebenfalls ein Ausreifungsmarker, der nach LPS-Stimulation verstärkt auf der Oberfläche vorkommt (Abb. 4-3) [26]. Um zu untersuchen, ob die MV-Infektion im Vergleich zu LPS einen Einfluss auf das CD150-Oberflächenniveau hat, wurden iDCs entweder mit MV IC323-GFP infiziert oder mit LPS ausgereift. Als Kontrollen wurden unbehandelte iDCs (KT) und Mock-behandelte iDCs (Mock) mitgeführt. 24 h später wurde die Menge an CD150 und die Effizienz der Ausreifung mittels CD86-Färbung auf der Oberfläche von DCs im Durchflusszytometer analysiert (Abb. 4-4). Der Ausreifungsmarker CD86 war auf mDCs sowie auf MV-behandelten DCs erhöht, unabhängig davon, ob die DCs infiziert waren (GFP⁺) oder nicht (GFP⁻). Im Vergleich zur KT war das CD150-Oberflächenniveau auf mDCs 2.2-fach höher und 1.2-fach höher auf den MV-behandelten DCs. Im Mittel waren 30% der MV-behandelten DCs GFP⁺. Wurden nur GFP⁺-DCs analysiert, konnte eine 1.5-fache Hochregulierung von CD150 im Gegensatz zu den GFP⁻-DCs detektiert werden, die gleiche Oberflächenniveaus wie unbehandelte (KT) und Mock-DCs aufwiesen. Infizierte DCs regulierten 24 h p.I. selektiv und moderat CD150 auf der Oberfläche hoch.

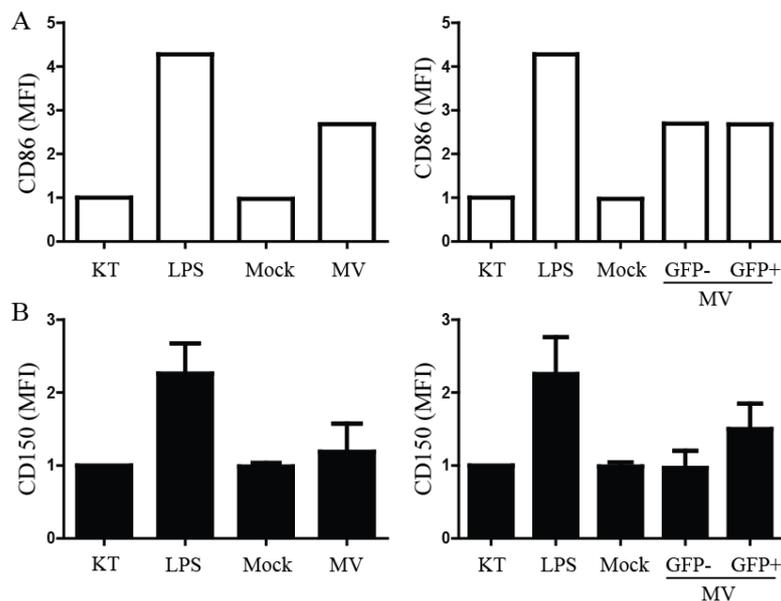


Abb. 4-4: CD150-Oberflächenexpression auf MV-DCs. Die Oberflächenexpression (MFI) des Ausreifungsmarkers CD86 und (B) des MV-Eintrittsrezeptors CD150 wurde auf unbehandelten (KT), Mock- und MV IC323-GFP (MOI 1)-infizierten iDCs sowie LPS-ausgereiften DCs 24 h p.I. im Durchflusszytometer gemessen. Die MFI der KT wurde gleich 1 gesetzt und die anderen Werte zu KT normalisiert. Die CD150-Färbung wurde in Duplikaten gemessen und der Mittelwert von 3 unabhängigen Experimenten in dem Diagramm dargestellt. Die Fehlerbalken zeigen die Standardabweichung.

Ergebnisse

iDCs besitzen eine hohe endozytotische Aktivität, die nach Ausreifung drastisch reduziert ist. Um die endozytotische Effizienz von MV-DCs zu untersuchen, wurden Mock-behandelte iDCs, MV-DCs und LPS-mDCs mit FITC-Dextran, einem hydrophilen Polysaccharid, bei 37°C gefüttert. Zur Kontrolle wurden die Zellen zusätzlich bei 4°C gefüttert, um die Endozytose zu inhibieren und die Hintergrundfluoreszenz bestimmen zu können. Nach 15, 30, 60 und 120 min FITC-Dextran-Exposition wurden die DCs gewaschen, fixiert und die Kinetik der FITC-Dextran-Endozytose im Durchflusszytometer analysiert, wobei die Hintergrundfluoreszenz (4°C) von dem gemessenen Wert (37°C) abgezogen wurde (Abb. 4-4). Wie erwartet besaßen iDCs die höchste endozytotische Aktivität, wohingegen mDCs kaum FITC-Dextran endozytiert hatten. Nach 120 min zeigten MV-DCs eine deutliche Reduktion der Endozytose um den Faktor 4.5 im Vergleich zu iDCs auf. Allerdings nahmen MV-DCs 3.3 mal mehr FITC-Dextran auf als mDCs. Das beschriebene Endozytose-Experiment offenbarte, dass MV-DCs Intermediate von iDCs und mDCs bezüglich ihrer endozytotischen Aktivität sind.

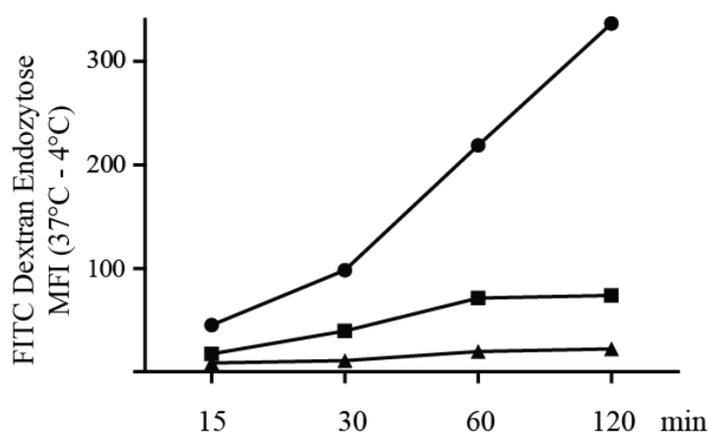


Abb. 4-5: MV-DCs haben eine reduzierte FITC-Dextran Endozytose-Fähigkeit. Mock-DC (●), MV-DC (■) und mDC (▲) wurden mit FITC-Dextran bei 4°C als Kontrolle und bei 37°C gefüttert. Nach den angegebenen Zeitpunkten wurden die Zellen fixiert und die FITC-Dextran-Aufnahme wurde mithilfe des Durchflusszytometers analysiert. Um die tatsächliche endozytotische Aktivität zu bestimmen, wurde die Hintergrundfluoreszenz (4°C) vom gemessenen Wert (37°C) abgezogen.

Zusammenfassend zeigten die Untersuchungen, dass MV die Ausreifung der DCs in Bezug auf CD86-Oberflächenexpression und Endozytose-Fähigkeiten induzierte, jedoch schwächer als LPS. Der Ausreifungsmarker CD150 wurde moderat auf der Oberfläche von MV-DCs hochreguliert.

Ergebnisse

4.1.3 Partikelmorphogenese und Freisetzung infektiöser Virionen in MV-DCs

DCs spielen eine wichtige Rolle für die Dissemination des MV durch Zell-Zell-Fusion *in vitro* und möglicherweise *de novo* Produktion infektiöser Partikel [17]. Die Fähigkeit infizierter DCs, infektiöse Partikel zusammenzubauen und freizusetzen, wurde in den folgenden Experimenten im Vergleich zu der MV-permissiven B-Zelllinie B95a untersucht.

iDCs und B95a-Zellen wurden für 2 h mit MV WTF (MOI 1) infiziert und anschließend in FIP-haltigem Medium für 24 und 48 h kultiviert. Um die Anzahl infizierter Zellen zu bestimmen, wurde 24 h p.I. ein Aliquot der Mock- und MV-behandelten Zellen abgenommen und im Durchflusszytometer auf die Expression viraler Proteine untersucht (Infektionskontrolle). Die Produktion und Freisetzung infektiöser Partikel wurde durch die Titration von Zellpellets und Zellüberständen bestimmt, um die Zell-assoziierte und freigesetzte Virusproduktion zu unterscheiden. Hierfür wurde das Zellpellet vom Überstand durch Zentrifugation separiert. Zellpellet und Überstand wurden mindestens über Nacht auf -80°C eingefroren, auf Eis aufgetaut und auf B95a-Zellen in 2 Verdünnungsreihen 1:4 und 1:5 titriert. Die Auswertung erfolgte 3 und 5 Tage nach der Titration. Die Infektionskontrolle zeigte, dass in allen durchgeführten Titrationsexperimenten vergleichbare Infektionseffizienzen erreicht wurden.

B95a-Zellen produzierten sowohl 24 h als auch 48 h p.I. die höchste Gesamt-Virusmenge, jeweils 1.2×10^3 bzw. 2×10^4 PFU/ml. Die Gesamt-Virusmenge infizierter DCs war um mindestens eine log-Stufe reduziert – nach 24 h 1.4×10^2 und nach 48 h Infektion 7.6×10^2 PFU/ml (Abb. 4-6A). Die Reduktion der Virusmenge von DCs im Vergleich zu B95a-Zellen war unabhängig von der MOI, da mit MOI 0.1 infizierte DCs ebenfalls eine log-Stufe weniger Virus produzierten. Die Zunahme der Zell-assoziierten Virusmenge von 24 auf 48 h stieg in DCs und B95a vergleichbar um etwa eine log-Stufe an. Für das Zell-assoziierte Virus ergab sich, dass infizierte B95a-Zellen 48 h p.I. 1.8×10^3 , hingegen MV-DC 2.4×10^2 PFU/ml produzierten. Die Titration der Zellüberstände zeigte, dass die Virusfreisetzung von MV-B95a-Zellen nach 48 h Infektion 1.8×10^4 bzw. von MV-DCs 5.2×10^2 PFU/ml betrug. Die Zunahme der freigesetzten Virusmenge war in B95a-Zellen höher, denn MV-B95a produzierten 43-mal mehr freies Virus im Zeitraum von 24 auf 48 h p.I., hingegen MV-DCs nur 7.6-mal mehr (Abb. 4-6B). Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass DCs weniger Virus produzierten als MV-permissive B95a-Zellen. Die Partikelmorphogenese und/oder die Virusfreisetzung sind möglicherweise in MV-DCs beeinträchtigt.

Ergebnisse

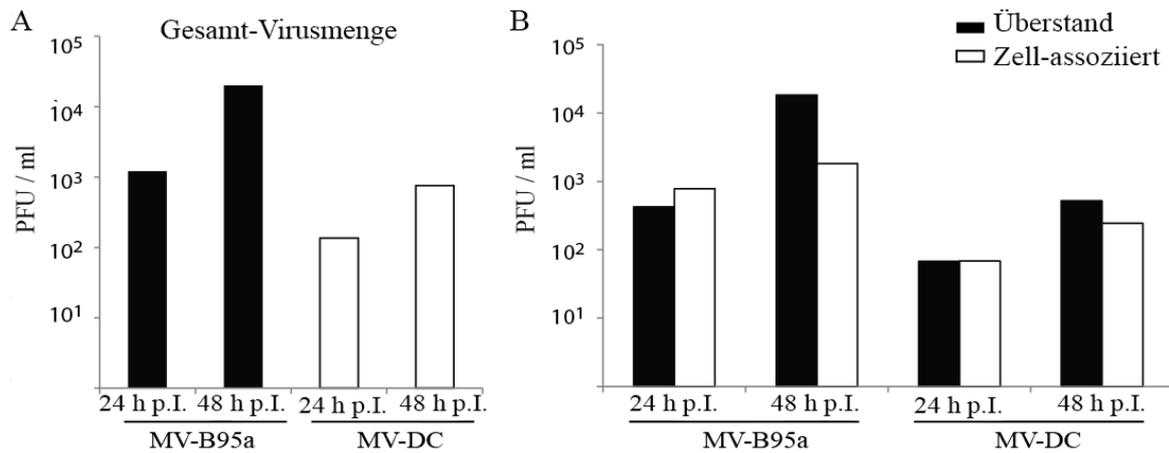


Abb. 4-6: Reduktion der Virusproduktion in MV-DCs. iDCs oder B95a-Zellen wurden mit WTF (MOI 1) infiziert. Zur Bestimmung der Virusmenge in Überständen und Zellpellets wurden diese geerntet, weggefroren, aufgetaut und auf B95a-Zellen in den Verdünnungsschritten 1:4 und 1:5 titriert. Die Auswertung der Titration erfolgte 3 und 5 Tage nach Titration. Der Mittelwert von 2 Titrationen ist im Diagramm dargestellt. Die gesamte Virusmenge ist in (A) dargestellt und die Zell-assoziierte und freigesetzte Virusmenge in (B).

4.1.4 Akkumulation von MV-Proteinen in MV-DCs

Eine mögliche Erklärung für die reduzierte MV-Partikelproduktion in DCs könnte eine Verminderung der viralen Proteinsynthese sein. Um die Akkumulation viraler Proteine zu untersuchen, wurden DCs und B95a-Zellen mit MV WTF (MOI 1) für 2 h infiziert. Anschließend wurde FIP zugegeben. Nach 24 und 48 h Infektion wurden die Zellen fixiert und die intrazelluläre Expression des viralen Matrixprotein M und Nukleokapsidprotein N (Abb. 4-7A, untere Reihe, links N-Protein, Mitte M-Protein) sowie zusätzlich zur intrazellulären Expression die Oberflächenexpression der Glykoproteine H & F (obere Reihe, links und Mitte H-Protein, rechts F-Protein) im Durchflusszytometer detektiert. Die Analyse der Expressionsniveaus aller untersuchten MV-Proteine zeigte zu allen Zeitpunkten eine schlechtere Akkumulation in DCs im Vergleich zu B95a-Zellen. Zusätzlich schien das Niveau zu stagnieren, da zwischen 24 und 48 h p.I. keine deutliche Zunahme zu erkennen war. Die Akkumulation des M-Proteins war im Durchflusszytometer nur schwach detektierbar. Jedoch war das Expressionsniveau in B95a-Zellen höher als in DCs. Um zu bestätigen, dass MV-DCs M-Proteine exprimierten, wurde die Akkumulation in Proteinlysaten zusätzlich im Western Blot untersucht (Abb. 4-7B). Zusammengefasst konnte gezeigt werden, dass DCs die MV-Replikation auf der Stufe der Proteinakkumulation restringierten, was eine Erklärung für die verminderte Partikelproduktion sein könnte.

Ergebnisse

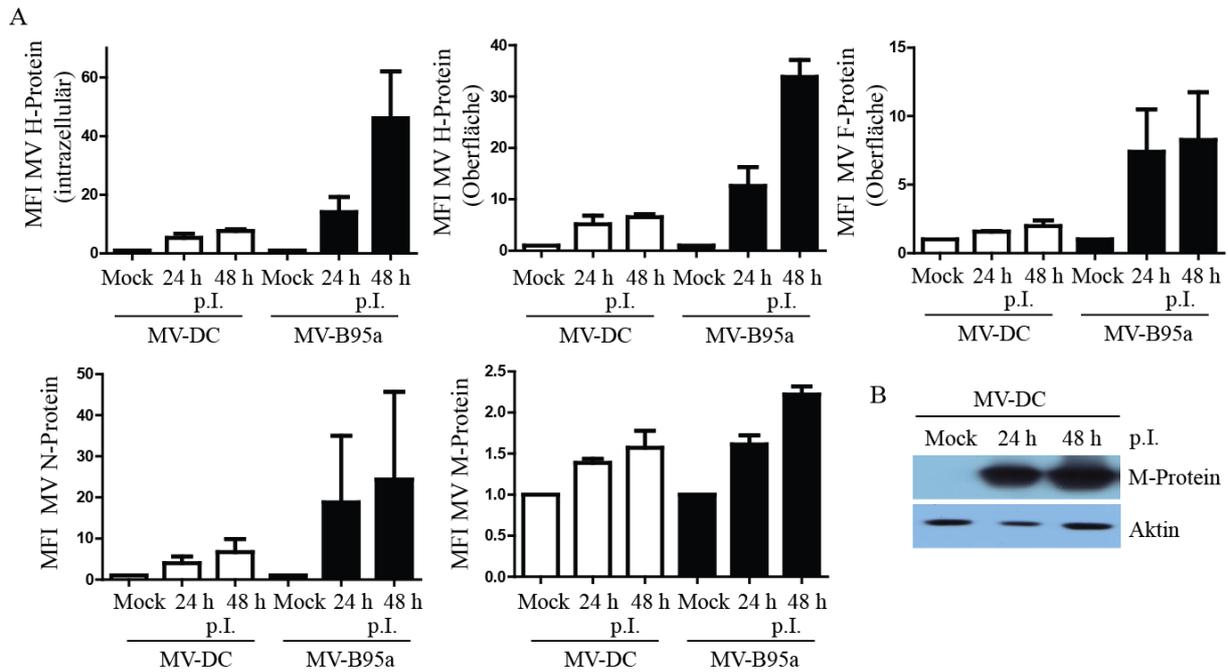


Abb. 4-7: Expression von MV-Proteinen in infizierten DCs und B95a-Zellen. (A) DCs und B95a-Zellen wurden mit WTF (MOI 1) infiziert. 24 h und 48 h p.I. wurden die Zellen geerntet, fixiert und für intrazelluläre Färbungen permeabilisiert. DCs wurden mit spezifischen Antikörpern gegen F-, H-, M- und N-Proteine gefärbt. Die Expression wurde mithilfe eines Durchflusszytometers analysiert. Die Ergebnisse von 2 Experimenten sind zusammengefasst und wurden entsprechend den Mock-Zellen normalisiert. (B) Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinlysaten von MV-DCs und anschließend der Nachweis der Expression des M-Proteins im Western Blot durch Verwendung von M-Protein- und Aktin-spezifischen (Ladekontrolle) Antikörpern.

4.1.5 Subzelluläre Verteilung der MV-Proteine in DCs

Zusätzlich zur limitierten Akkumulation viraler Proteine könnten zelltypspezifische Unterschiede in der subzellulären Verteilung der viralen Proteine zu der verminderten Virusproduktion in DCs führen. In den nachfolgenden Experimenten wurde die Assoziation des M-Proteins mit detergentenresistenten Membranfraktionen (DRMs) durch Dichtegradientenzentrifugation sowie die subzelluläre Lokalisation und Verteilung von viralen Proteinen in DCs im Fluoreszenzmikroskop untersucht.

4.1.5.1 DRM-Assoziation des M-Proteins

DRMs, auch Lipid Rafts genannt, sind Glykosphingolipid- und Cholesterolreiche Mikrodomänen, die einerseits als Plattformen für Signaltransduktionen [131] und andererseits für Viruspartikel-Morphogenese und Freisetzung, einschließlich des MV, von Bedeutung sind [64,

Ergebnisse

132, 133]. Das MV M-Protein ist relevant für den Zusammenbau viraler Partikel [37, 59]. In MV-ED infizierten BJAB-Zellen waren 35% des M-Proteins mit DRM assoziiert [64].

Um die Assoziation des M-Proteins mit DRMs in DCs zu untersuchen, wurden DCs mit MV WTF (MOI 1) für 2 h infiziert und 48 h in FIP-haltigem Medium kultiviert. Die Lysate wurden nach einer Dichtegradientenzentrifugation und Fraktionierung auf ein SDS-Gel aufgetragen. Neben dem M-Protein wurde CD55 als Marker für DRMs nachgewiesen. 25 % des M-Proteins assoziierte mit den DRM-Fraktionen in MV-DCs (Abb. 4-8A). Es konnte gezeigt werden, dass das M-Protein in infizierten DCs die Fähigkeit besaß, mit DRMs zu assoziieren. Cholera-toxin (CTX) ist ein Proteinkomplex, der vom Bakterium *Vibrio cholerae* produziert wird. Die CTX B-Untereinheit formt einen Ring, der an das GM1 Gangliosid bindet, ein Glykosphingolipid, das konzentriert in Lipid Rafts auftritt. In IF-Färbungen clusterte das M-Protein an der Plasmamembran und kolokalisierte partiell mit CTX B⁺-Regionen (gekennzeichnet durch Pfeile, gelbe Färbung) (Abb. 4-8B).

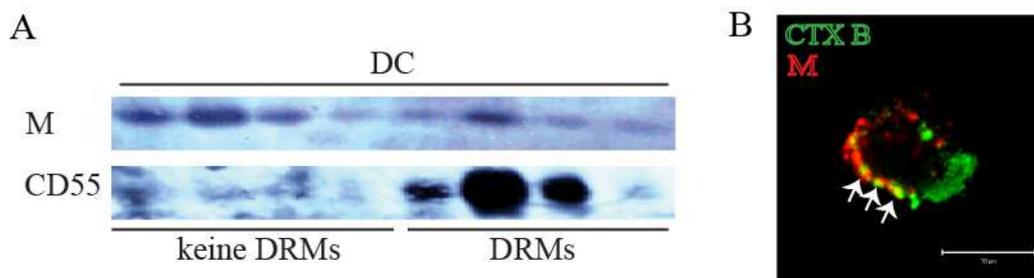


Abb. 4-8: M-Protein-Assoziation mit DRMs. (A) WTF-infizierte DCs wurden 48 h p.I. lysiert, nach einer Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation und Fraktionierung gelelektrophoretisch aufgetrennt (15% Acrylamid) und im Western Blot auf das Vorkommen von M-Proteinen und CD55 (als Marker für DRMs) untersucht. Die Analyse der Verteilung erfolgte mithilfe des AIDA Image Analyzer. (B) IF-Färbung von WTF-infizierten DCs. Kofärbungen wurden mit CTX B und CTX B-spezifischen Antikörper zusammen mit M-Protein spezifischen Antikörpern durchgeführt und mithilfe des Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.1.5.2 Kolokalisationsanalyse der MV-Proteinen in infizierten DCs

Um zelltypspezifische Unterschiede in der subzellulären Verteilung der MV-Proteine in DCs im Vergleich zu B95a-Zellen zu untersuchen, wurden die Zellen 2 h mit MV WTF (MOI 1) infiziert und 24 h in FIP-ergänzten Medium kultiviert. MV-DCs wurden auf PLL-behandelten Objektträgern ausgesät, währenddessen wuchsen B95a-Zellen auf Deckgläsern. 24 h p.I. wurden die Zellen fixiert, permeabilisiert und mit entsprechenden spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Assoziation der MV-Proteine untereinander und mit zellulären Kompartimenten wurde mittels konfokaler IF-Mikroskopie analysiert und quantifiziert. Zur Kontrolle wurden

Ergebnisse

Mock-behandelte DCs gefärbt. Um eine Überstrahlung der Fluoreszenzkanäle und damit falsch positive Ergebnisse auszuschließen, wurden die Aufnahmen mit Anregung durch jeweils nur einen Laser gemacht und mithilfe der Software des Mikroskops wieder überlagert. Die Fluoreszenzaufnahmen eines Antikörperpaares wurden unter der Verwendung gleicher Lasereinstellungen gemacht.

Für die Quantifizierung wurde der Pearson Kollokalisationskoeffizient (R_r) mit der Software Image J berechnet. R_r -Werte zwischen 0.5 und 0.7 werden als partielle Kollokalisierung definiert und Werte über 0.7 entsprechen einer Kollokalisierung zweier gefärbter Proteine.

4.1.5.3 Kollokalisierung der MV-Proteine

Die MV-Replikation, die Akkumulation der viralen Proteine sowie ihr abgestimmter Transport zu den *assembly sites* sind Stufen im Lebenszyklus des Virus, die zelltypspezifisch modifiziert und für die experimentell gezeigte Reduktion der Virusproduktion von MV-DCs im Vergleich zu infizierten B95a-Zellen verantwortlich sein könnten (Abb. 4-6, 4-7).

Zuerst wurde die subzelluläre Verteilung und Kollokalisierung der viralen Proteine untereinander in infizierten DCs untersucht. Das N-Protein und P-Protein bildeten auffällige perinukleäre Aggregate. Hingegen war das M-Protein zum Teil mit dem Zytoplasma assoziiert, gleichzeitig aber auch im Zytoplasma verteilt. Der größte Teil des H-Proteins lag in Assoziation mit der Plasmamembran vor. Auffällig war, dass mit Ausnahme der P- / H-Färbung die MV-Proteine eine in DCs deutlichere Kokompartimentierung aufwiesen als in B95a-Zellen (Abb. 4-9). Die N- / P-Cluster könnten Replikationskomplexe darstellen. In B95a-Zellen lag für die meisten MV-Protein-Färbekombinationen nur eine partielle Kollokalisierung vor. Einzig P- und H-Protein lokalisierten nie in den gleichen Zellkompartimenten ($R_r = 0.4$). Die Kollokalisationsanalyse von H-Protein und CD150 zeigte eine deutliche Assoziation beider Moleküle in sowohl DCs und B95a-Zellen ($R_r = 0.8$).

Die höhere Kollokalisierung viraler Proteine in DCs im Vergleich zu B95a-Zellen könnte auf eine Assoziation des MV mit DC-spezifischen Kompartimenten, die entscheidend für die Replikation des Virus sind, oder auf eine DC-spezifische Sortierung neu synthetisierter MV-Proteine hinweisen. Um die Assoziation viraler Proteine mit Kompartimenten detaillierter zu untersuchen, erfolgten weitere Kollokalisationsanalysen mit MV Proteinen, vorwiegend mit dem M-Protein, und Kompartiment-spezifischen Markern.

Ergebnisse

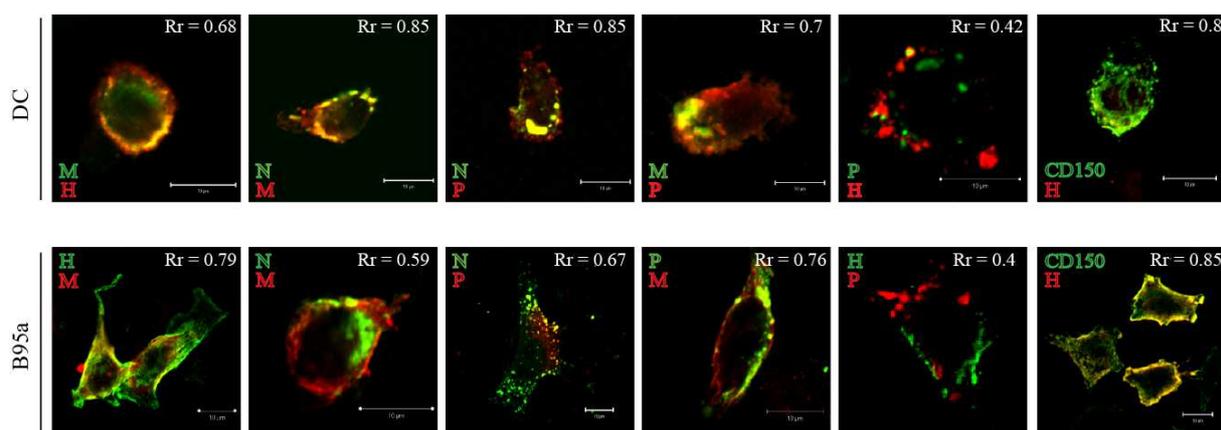


Abb. 4-9: Kolokalisationsanalysen der MV-Proteine und CD150 in infizierten DCs und B95a-Zellen. MV-DCs und B95a wurden mit MV-Proteinen und CD150-spezifischen Antikörpern gefärbt, im IF-Mikroskop analysiert und mithilfe des berechneten Pearson Koeffizienten (Rr) von Image J quantifiziert.

4.1.5.4 Kolokalisation des M-Proteins mit Komponenten des sekretorischen Transportweges

Sequentielle Kompartimente des sekretorischen Transportweges sind das raue Endoplasmatische Retikulum (ER), welches durch das membranständige Chaperon Calnexin markiert wird, das ER-Golgi-Intermediate Kompartiment (Marker: ERGIC53, ein Mannose-bindendes membranständiges Lektin) und der Golgi-Apparat, unterteilt in *cis*- (Marker: GM130) und *trans*-Golgi-Netzwerk (TGN) (Marker: TGN46), von wo Proteine in sekretorische Vesikel verpackt werden, die anschließend mit der Plasmamembran fusionieren und ihr Cargo in den Überstand abgeben.

Erwartungsgemäß war das M-Protein im Gegensatz zu den MV-Glykoproteinen nicht mit dem Golgi-Apparat (*cis* und *trans*) assoziiert. Die vergleichende Analyse der subzellulären Verteilung von M-Proteinen zeigte keine Unterschiede in der Assoziation mit ERGIC und COP I-Vesikeln, deren Funktion der retrograde Cargo-Transport vom *cis*-Golgi-Netzwerk zum ER ist. Für ERGIC und COP I-Vesikeln wurden jeweils partielle Kolokalisationen mit M-Protein detektiert. Auffallend war, dass M-Proteine zwar in B95a, nicht jedoch in MV-DCs partiell mit Calnexin (ER) assoziierten.

Ergebnisse

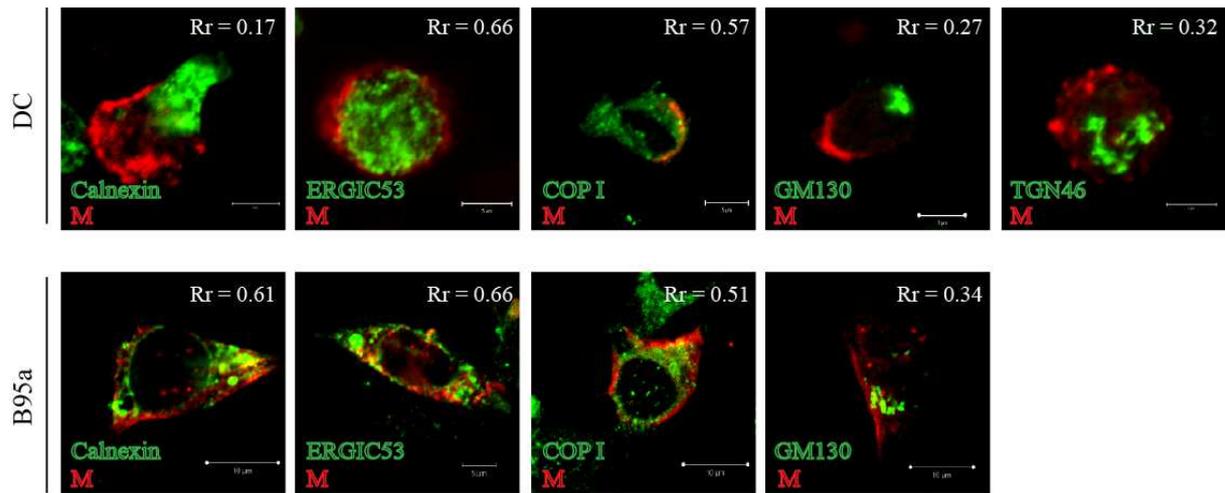


Abb. 4-10: Kolokalisationsanalyse des M-Proteins mit Markerproteinen des sekretorischen Transportweges in infizierten DCs und B95a-Zellen. MV-DCs und B95a wurden mit spezifischen Antikörpern für die Markerproteine des ER (Calnexin), ERGIC (ERGIC 53), *cis*-Golgi (GM130) und *trans*-Golgi Netzwerk (TGN46) in Kombination mit MV M-Protein gefärbt, im IF-Mikroskop analysiert und mithilfe des berechneten Pearson Koeffizienten (Rr) von Image J quantifiziert.

4.1.5.5 Kolokalisation der MV-Proteine mit Markerproteinen der endosomalen und lysosomalen Transportwege

Die wichtigen Komponenten des endosomalen Transport- und Sortierungsweges sind die frühen (Marker: EEA1) und *recycling* Endosomen (Marker: CD71), die Moleküle an der Plasmamembran internalisieren und im Fall des *recycling* Endosomen wieder zur Oberfläche zurückführen. Die Analyse der Kolokalisation des M-Proteins mit EEA1 in MV-DCs ergab keine Assoziation, jedoch eine partielle in B95a-Zellen. Ob die detektierte partielle Kolokalisation des M-Proteins mit CD71 DC-spezifisch war, konnte aufgrund der fehlenden Analyse der B95a-Zellen nicht gezeigt werden. Der Adapterprotein-Komplex 3 (AP-3) kommt im TGN und in endosomalen Membranen vor und reguliert den Vesikeltransport von späten Endosomen (Marker: LAMP 1), *multivesicular bodies* (MVB) und Lysosomen (Marker: LysoTracker) [134]. AP-3 kolokalisierte partiell in DCs und B95a-Zellen. Jedoch konnte weder eine Assoziation des M-Proteins mit LAMP1⁺- oder LysoTracker⁺-Kompartimenten noch eine Kolokalisation des H-Proteins mit Lysosomen festgestellt werden. Diese Beobachtungen stimmten mit denen in B95a-Zellen überein.

DALIS (Marker: poly-Ubiquitin (poly-Ub), AK-Klon FK2) sind DC-spezifische Strukturen, die sich 8-16 h nach LPS-Ausreifung bilden, und neusynthetisierte, falsch gefaltete, polyubiquitinylierte Proteine transient aggregieren [135]. Die Analyse der subzellulären Verteilung

Ergebnisse

lung wies auf, dass neusynthetisierte M-Proteine 24 h nach Infektion nicht in DALIS aggregierten. Zusätzlich wurde die Kollokalisierung des M-Proteins mit Peptid-beladenen MHC II-Komplexen (pMHC II, Marker: CDw78, AK-Klon FN1) untersucht. Eine schwache partielle Assoziation mit M-Protein konnte für DCs festgestellt werden, jedoch nicht für B95a-Zellen.

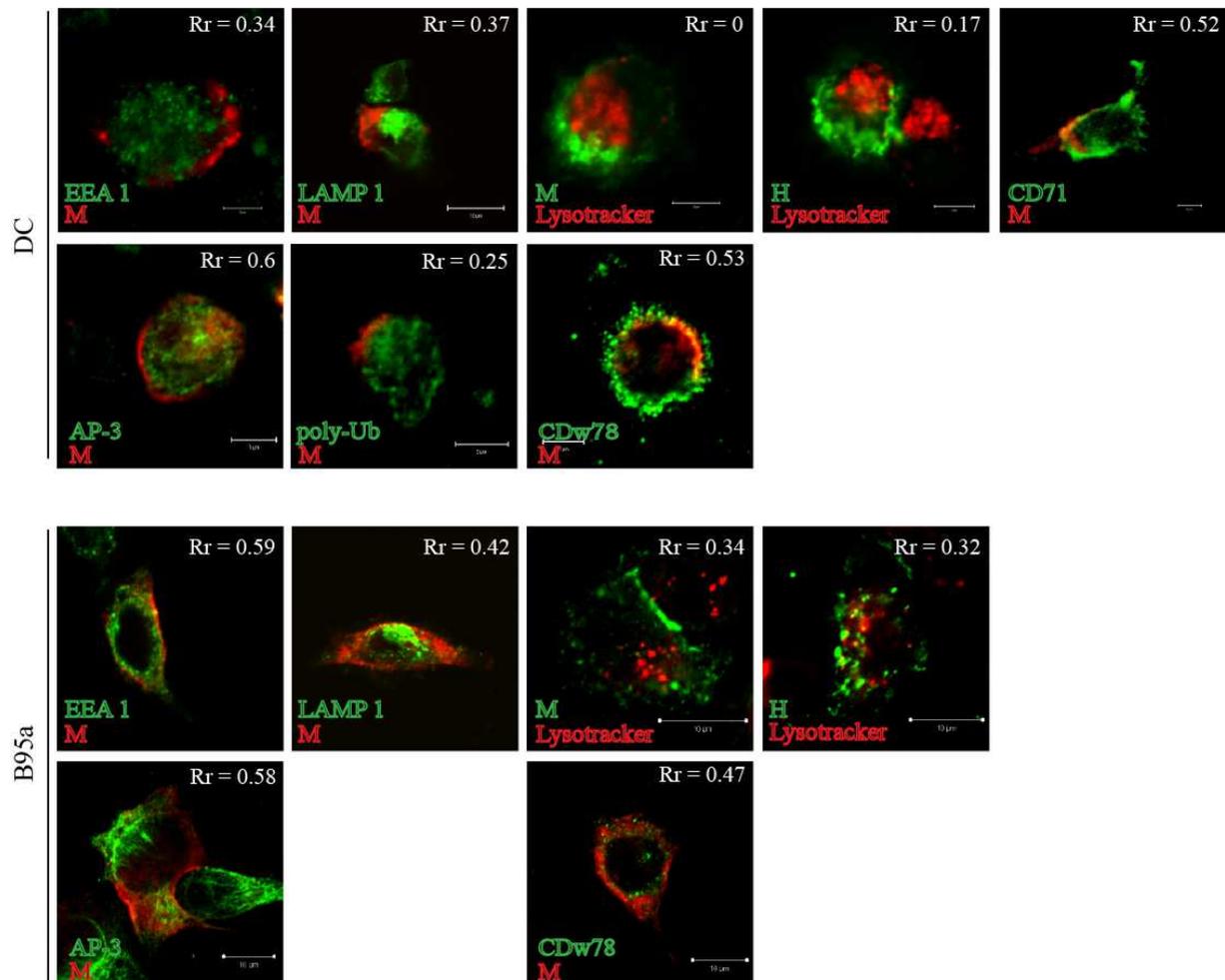


Abb. 4-11: Kollokalisationsanalyse der M-Proteine mit Markern der endosomalen und lysosomalen Transportwege in infizierten DCs und B95a-Zellen. MV-DCs und B95a-Zellen wurden mit spezifischen Antikörpern für die Markerproteine frühe (EEA1), *recycling* (CD71) und späte Endosomen (LAMP1), Lysosomen (LAMP1 lysotracker), AP-3-Vesikel, DALIS (poly-Ubiquitin, FK2) und pMHC II (CDw78, FN1) in Kombination mit MV H- bzw. M-Protein gefärbt und im IF-Mikroskop analysiert mithilfe des berechneten Pearson Koeffizienten (Rr) von Image J quantifiziert.

4.1.5.6 Kollokalisierung der MV-Proteine mit Tetraspaninen

Mitglieder der Tetraspanin-Familie sind Oberflächen-Glykoproteine, die lateral assoziieren, um Mikrodomänen zu bilden (*tetraspanin-enriched microdomains* – TEMs), in denen verschiedene Oberflächenrezeptoren dynamisch akkumulieren, z.B. pMHC II [136] und Integrine

Ergebnisse

[137]. Tetraspanine modulieren Zellmotilität, Fusion, Adhäsion und Proteintransport [138]. Für die Dissemination von HIV-1 sind TEMs als *budding sites* von besonderer Bedeutung, [139]. In Makrophagen assoziieren CD9, CD53 und CD81 auf der Zelloberfläche und in intrazellulären Vakuolen-ähnlichen Vesikeln, während CD63 als Marker für MVBs gilt [140]. In MV-DCs assoziierte das M-Protein partiell mit CD53 und CD81, jedoch nicht mit CD9 und CD63. Hingegen kolokalisierte das M-Protein in infizierten B95a-Zellen mit keinem der Tetraspanine CD9, CD53 oder CD63. Das P-Protein war in MV-DCs partiell kodetektierbar mit CD9, CD63, jedoch nicht mit CD81. Die Analyse dieser Kofärbungen in B95a-Zellen wies nach, dass das P-Protein nicht mit CD9 assoziierte, allerdings deutlich mit CD63 und CD81 kolokalisierte. Die Assoziation des H- und N-Proteins mit CD9 war partiell und vergleichbar in DCs und B95a-Zellen. Auffällig stark unterschied sich die Assoziation der viralen Proteine mit den Tetraspaninen in B95a-Zellen und DCs. Die subzelluläre Assoziation der viralen Proteine in DCs war mit allen untersuchten Tetraspanine ungefähr gleich stark ($R_r = 0.39-0.59$). Im Gegensatz dazu variierten die Assoziationen viraler Proteine mit bestimmten Tetraspaninen in B95a-Zellen ($R_r = 0.17-0.8$). Möglicherweise sind die Tetraspanine spezifischer für ihre Assoziation mit viralen Proteinen, z.B. CD63 / CD81 und P-Proteine in infizierten B95a-Zellen.

Ergebnisse

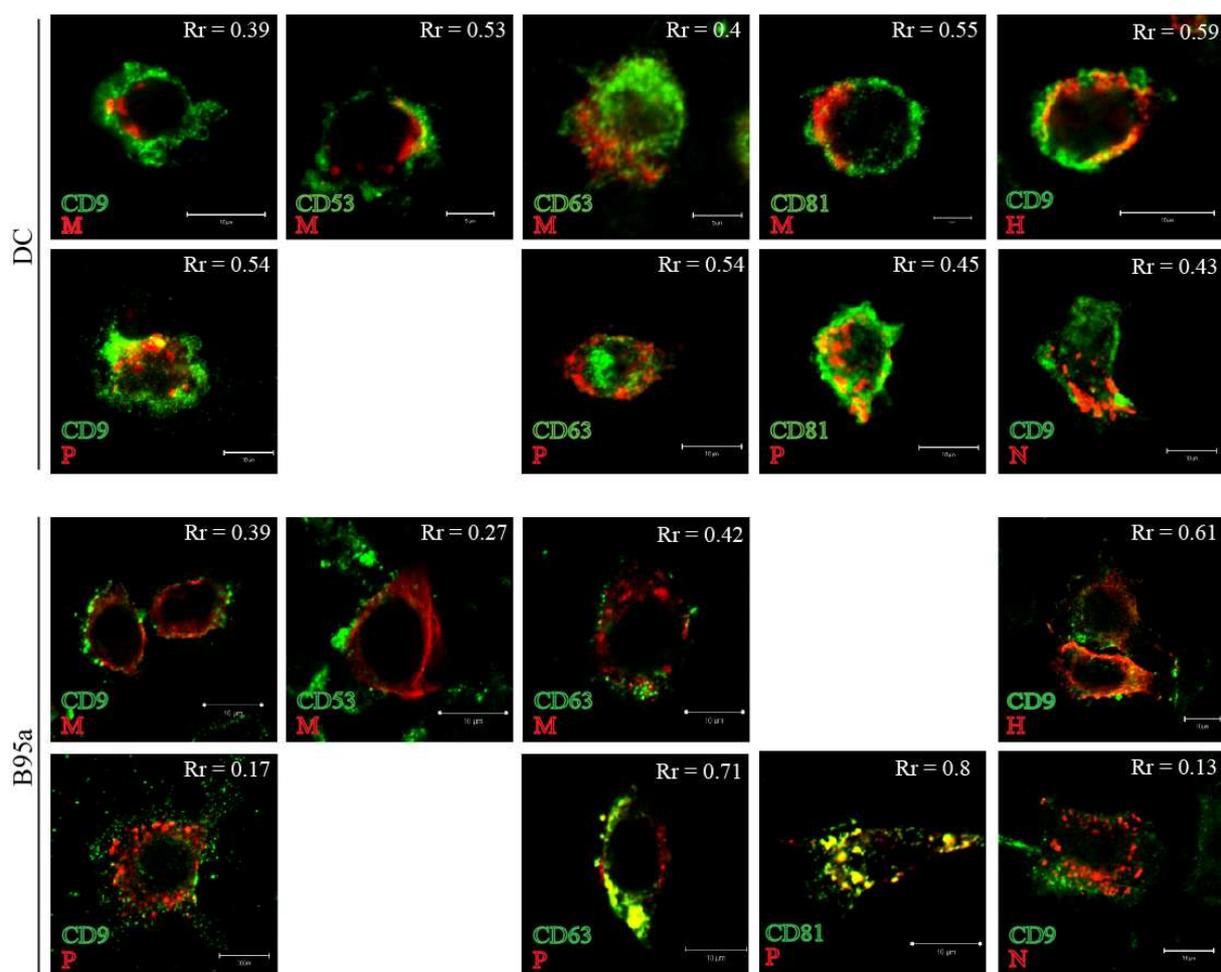


Abb 4-12: Kolokalisationsanalyse der MV-Proteine mit Tetraspaninen in infizierten DCs und B95a-Zellen. MV-DCs und B95a wurden mit spezifischen Antikörpern für die Tetraspanine CD9, CD53, CD63 und CD81 in Kombination mit MV H-, M-, N- und P-Protein-spezifischen Antikörpern gefärbt, im IF-Mikroskop analysiert und mithilfe des berechneten Pearson Koeffizienten (Rr) von Image J quantifiziert.

Alle vergleichenden Kolokalisationsanalysen zur Bestimmung der subzellulären Verteilung viraler Proteine in MV-DCs und MV-B95a-Zellen wurden in der folgenden Tabelle zusammengefasst.

Färbung	DC	B95a	Färbung	DC	B95a
MV-Proteine			Lysosomaler Transport		
MV M + H	+	+++	LAMP1 + MV M	-	-
MV M + N	+++	+	Lysotracker + MV M	-	-
MV N + P	+++	+	Lysotracker + MV H	-	-
MV M + P	+++	+++	AP3 + MV M	+	+
MV H + P	-	-	DALIS+MV M	-	n.d.
MV H + CD150	+++	+++	pMHC II + MV M	+	-

Ergebnisse

Sekretorischer Transportweg			Tetraspanine		
ER + MV M	-	+	MV M + CD9	-	-
ERGIC + MV M	+	+	MV M + CD53	+	-
COP I + MV M	+	+	MV M + CD63	-	-
Cis-Golgi + MV M	-	-	MV M + CD81	+	n.d.
TGN + MV M	-	n.d.	MV P + CD9	+	-
			MV P + CD63	+	+++
Endosomaler Transport			MV P + CD81	-	+++
EEA1 + MV M	-	+	MV N + CD9	-	-
CD71 + MV M	+	n.d.	MV H + CD9	+	+

Tabelle 4-1: Zusammenfassung der Kollokalisationsanalysen zur Bestimmung der subzellulären Verteilung viraler Proteine. Rr < 0.5 = -, 0.5 < Rr < 0.7 = +, Rr > 0.7 = +++, n.d. – nicht bestimmt.

Es konnte gezeigt werden, dass unabhängig von der eingesetzten MOI, die MV-Virusproduktion in infizierten DCs im Vergleich zu B95a-Zellen beeinträchtigt war (Abb. 4.6, 4-7). Um zu klären, warum es zu der beobachteten Verminderung kam, wurde die Replikation und Akkumulation viraler Proteine analysiert. Die Experimente zeigten, dass die viralen Proteine F, H, M und N in DCs akkumulierten und die Glykoproteine zur Plasmamembran transportiert wurden, allerdings weniger effizient als in B95a-Zellen. Des Weiteren könnten die Sortierung und der Transport viraler Proteine zu Membrandomänen oder Kompartimente in DCs beeinträchtigt sein. Deshalb wurde die subzelluläre Verteilung der viralen Proteine und im Besonderen der M-Proteine untersucht, um Veränderungen zu finden, die entscheidend für die beobachtete Verminderung sein könnten.

Generell ist zu sagen, dass die MV-Protein-Cluster, die in Abb. 4-9 zu sehen sind, keinem Kompartiment in MV-DCs eindeutig zuzuordnen waren. Die Kollokalisationsanalysen zeigten, dass viralen Proteine stark assoziierten, wobei in MV-DCs im Vergleich zu B95a-Zellen die Kollokalisationsmuster nicht gleich waren. Es konnten keine zelltypischen Unterschiede in der subzellulären Verteilung mit Markern des sekretorischen Transportweges (Ausnahme Calnexin) und nur geringe Unterschiede mit Markern des endosomalen Transportweges detektiert werden. Die auffälligsten Unterschiede wurden bei Kollokalisationsanalysen mit Tetraspaninen deutlich. Entweder zeigten in B95a-Zellen die viralen Proteine starke oder keine Assozia-

tionen im Gegensatz zu DCs, wo alle viralen Proteine nur partiell oder gar nicht kolokalisieren.

Die Kolokalisationsanalysen wurden mit fixierten Zellen durchgeführt. Eine partielle Lokalisation könnte bedeuten, dass das Kompartiment eine Station auf dem Transportweg der viralen Proteine zu den *assembly sites* ist, aber dort nicht gelagert werden. Um die subzelluläre Verteilung *de novo*-synthetisierter M-Proteine untersuchen zu können, wurde ein Methode gebraucht, die die Detektion des M-Proteins in lebenden DCs ermöglicht.

4.2 MV M-Tetracystein-Fusionsprotein

Um die subzelluläre Verteilung des M-Proteins nicht nur in fixierten Zellen mittels Antikörper-Färbung untersuchen zu können, wurde nach einer Methode gesucht, um den dynamischen Transport des M-Proteins in lebenden Zellen zu detektieren.

Fluorescence arsenical hairpin binder (FIAsH) bindet an 6 Aminoäuren kurze Peptidsequenzen. Diese Sequenzen besitzen 4 Cysteine (Tetracystein, TC, CCXXCC) [141]. Vorangegangene Untersuchungen zeigten, dass die flankierenden Sequenzen einen Effekt auf die Bindung von FIAsH haben, gekennzeichnet durch höhere Fluoreszenz-Quantenausbeute und eine dramatisch verbesserte Dithiol-Resistenz im Zusammenhang mit stringenteren Waschkonditionen. Die beiden experimentell vorgeschlagenen Markersequenzen sind 12 Aminosäuren lang und haben die Sequenzen FLNCCPGCCMEP und HRWCCPGCCKTF [128]. Die nachfolgend dargestellten Daten wurden in Zusammenarbeit mit Linda Rennick, QUB, erhoben, die die Klonierung aller verwendeten Expressionskonstrukte und rekombinanter Viren (sowie deren Rescue) durchführte.

4.2.1 Das rekombinante MV M-TC Protein

Der 6 Aminosäuren lange Tag wurde zunächst an den C-Terminus des M-Proteins der MV-Stämme IC323 und Edmonston kloniert, die kodierten Fusionsproteine wurden als M-TC (323) und M-TC (ED) bezeichnet. Nachfolgend wurde der 12 Aminosäuren lange Tag FLNCCPGCCMEP an den C-Terminus kloniert, die kodierten Fusionsproteine wurden M323-TC und M ED-TC benannt, abhängig vom MV-Stamm (Abb. 4-19).

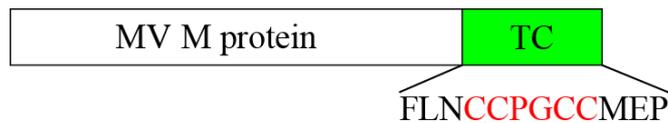


Abb. 4-13: Schematische Darstellung des M323-TC Fusionsprotein. Der 12-Aminosäuretag inklusive des TC-Motives wurde c-terminal an das MV M-Protein fusioniert.

4.2.2 Charakterisierung des rekombinanten M323-TC Proteins

Die Fusion des Tags an das M-Protein könnte die Eigenschaften des Proteins verändern. Deswegen wurden Experimente zur Charakterisierung des Fusionsproteins durchgeführt. Zuerst wurden die Expression und Akkumulation des M323-TC Proteins in transfizierten, fixierten HeLa-Zellen konventionell mit MV M-spezifischen Antikörpern zusammen mit Phalloidin analysiert und in lebenden Zellen die Detektierbarkeit des Fusionsprotein mit TC-Tagbindenden FAsH bzw. ReAsH-Reagenzien untersucht. 24 h nach der Transfektion exprimierten HeLa-Zellen transient M323-TC, das mittels Fluoreszenzmikroskopie nachgewiesen wurde. Das Detektionsniveau war vergleichbar, unabhängig davon, ob spezifische M-Antikörper oder FAsH benutzt wurden. Auffällig war, dass die Intensität der FAsH-Färbung sensitiver als die der ReAsH-Färbung war. Die subzelluläre Verteilung des M323-TC-Proteins zeigte mit konventioneller Antikörper- und FAsH-Färbung eine Akkumulation im Zytoplasma (Abb. 4-14). Neben der Immunfluoreszenz wurde die Transfektionseffizienz im Durchflusszytometer analysiert. Ein Beispiel ist in Abb. 4-15A dargestellt.



Abb 4-14: Transiente Expression des Fusionsproteins M323-TC in transfizierten HeLa-Zellen. HeLa-Zellen wurden transfiziert, um M323-TC zu exprimieren. 24 h nach der Transfektion wurden die Zellen entweder mit M-spezifischen Antikörpern zusammen mit Phalloidin oder FAsH oder ReAsH separat gefärbt.

Das MV M-Protein ist für den Zusammenbau und die Abschnürung viraler Partikel von besonderer Bedeutung. Hierfür spielen die Assoziation des M-Proteins mit DRMs und die Fähigkeit der Oligomerisierung eine zentrale Rolle. Die DRMs sind Plattformen für den Zusammenbau und Freisetzung von MV-Partikeln [64, 66]. Um die DRM-Assoziation des

Ergebnisse

M323-TC Fusionsprotein zu untersuchen, wurden 293T-Zellen transfiziert. 24 h nach Transfektion wurden Lysate hergestellt und nach einer Dichtegradientenzentrifugation und Fraktionierung auf ein SDS-Gel aufgetragen (siehe Abb. 4-8). Neben M323-TC wurde CD55 als Marker für DRMs nachgewiesen. Das Experiment zeigte, dass 24 % der M323-TC-Proteine mit DRMs assoziierten und bewies, dass der TC-Tag keinen Einfluss auf die DRM-Assoziation des M-Proteins hatte (Abb. 4-15B). M-Proteine oligomerisieren und treiben so die Formation von VLPs an [59]. Um die Fähigkeit der Induktion von VLPs und deren Freisetzung in den Überstand durch M323-TC zu untersuchen, wurden 293T-Zellen transfiziert, um M323-TC zu exprimieren. 48 h nach der Transfektion wurden Zelllysate hergestellt und die Überstände gesammelt. VLPs wurden durch Ultrazentrifugation der Überstände sedimentiert. Durch die Auftrennung im SDS-Gel und Western Blotting konnte die Menge an M323-TC im Überstand mittels M Protein-spezifischer Antikörper ermittelt werden. M323-TC wurde in den Zelllysaten, aber auch in den Überständen detektiert. So konnte gezeigt werden, dass der TC-Tag keinen Einfluss auf die VLP-Bildung hat (Abb. 4.15C).

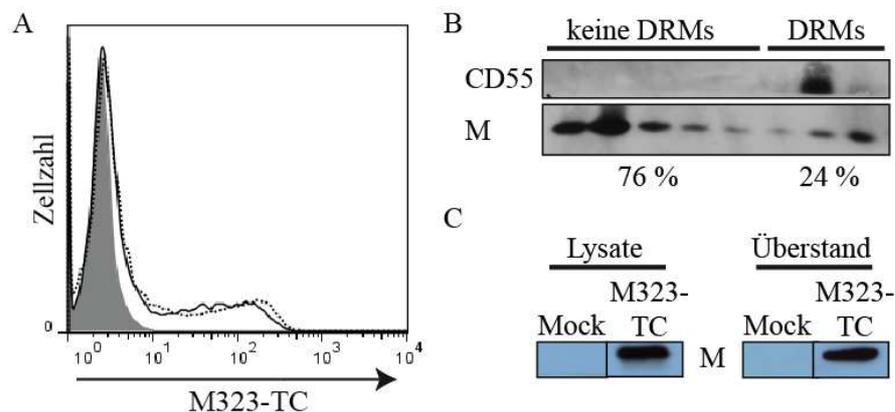


Abb. 4-15: M323-TC ist DRM-assoziiert und treibt die VLP Formation an. (A) Analyse der M323-TC Expression in PEI-transfizierten HeLa-Zellen 24 h nach der Transfektion. Untransfizierte Zellen (Mock) dienen als Kontrolle (graue Linie). (B+C) 293T-Zellen wurden transfiziert, um M323-TC zu exprimieren. (B) Die Lysate wurden mittels Saccharose-Dichtegradientenzentrifugation und Fraktionierung gelelektrophoretisch aufgetrennt und im Western Blot untersucht. (C) Für den VLP-Assay wurden die Überstände 48 h nach der Transfektion ultrazentrifugiert und das sedimentierte Material wurde mit den Lysaten gelelektrophoretisch aufgetrennt. Im Western Blot wurde M323-TC mit M-spezifischen Antikörpern detektiert. Untransfizierte Zellen (Mock) dienen als Kontrolle.

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass das getaggte M323-TC Protein alle getesteten biologischen Eigenschaften aufwies. Für Untersuchungen des Transports in lebenden DCs ist es wichtig, M323-TC in DCs zu exprimieren. Dafür wurden DCs mit Amaxa® transfiziert und 5 h nach Transfektion die Expression mittels FIAsh-Färbung im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Neben eindeutig nicht fluoreszierenden Zellen konnten sowohl in den nicht trans-

Ergebnisse

fizierten als auch in den transfizierten Ansätzen schwach fluoreszierende Zellen detektiert werden. Dies lässt auf eine unspezifische Hintergrundfärbung des FAsH-Reagenz schließen, weil die Antikörper-Färbungen diese Hintergrundfärbungen nicht zeigten (Abb. 4-16, mit Pfeilen gekennzeichnet). Zusätzlich konnten in der transfizierten Fraktion stark fluoreszierende DCs nachgewiesen werden, die ein helles FAsH-Muster aufwiesen, das Proteinaggregate oder kompartimentiertes M323-TC darstellen könnte.

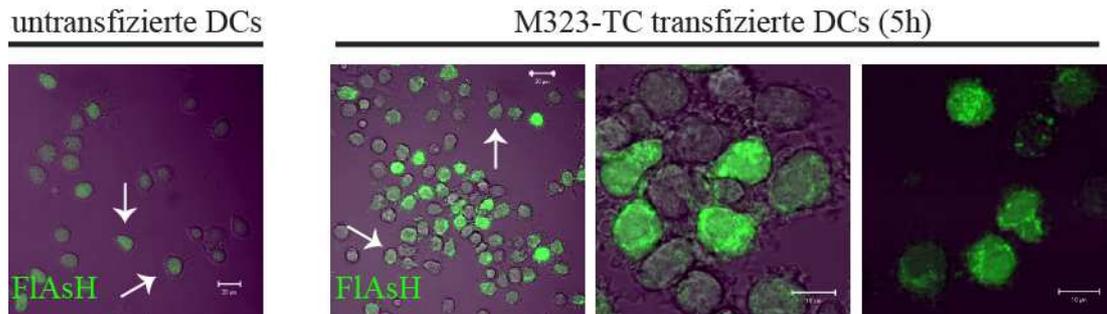


Abb. 4-16: FAsH-Färbung von M323-TC-transfizierten DC. DCs wurden mit Amaxa® transfiziert, um M323-TC zu exprimieren. 5 h nach der Transfektion wurden lebende DCs mit FAsH gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

4.2.3 rMV323 M-TC - Infektion von Zellen

Um die subzelluläre Verteilung des M-Proteins und dessen Transport im Kontext einer MV-Infektion untersuchen zu können, wurde ein rekombinantes IC323 Virus generiert, das anstelle des M-Protein, das M323-TC Protein exprimiert (rMV323 M-TC). Das Virus wurde auf Vero-Zellen passagiert, die stabil CD150 / SLAM exprimierten (Vero SLAM-Zellen). Die mittels Viruszucht erhaltenen Titer waren nie höher als 4×10^4 PFU / ml. Um die Virustiter zu erhöhen, wurden Vero SLAM-Zellen zusätzlich vor der Infektion transfiziert, um MV M-Protein (WTF) zu exprimieren. Durch die Transfektion konnte jedoch keine Erhöhung der Titer erreicht werden. Abb. 4-17 zeigt eine typische rMV323 M-TC – Infektion von Vero SLAM-Zellen. Innerhalb von 2 Tagen nach der Infektion fusionierten die Zellen und formten Plaques, die sich dann ab dem 3. Tag nicht weiter ausbreiteten, sondern begannen sich abzulösen. Zusätzlich wurde beobachtet, dass sich an den Rändern der Plaques Blasen bildeten.

Ergebnisse

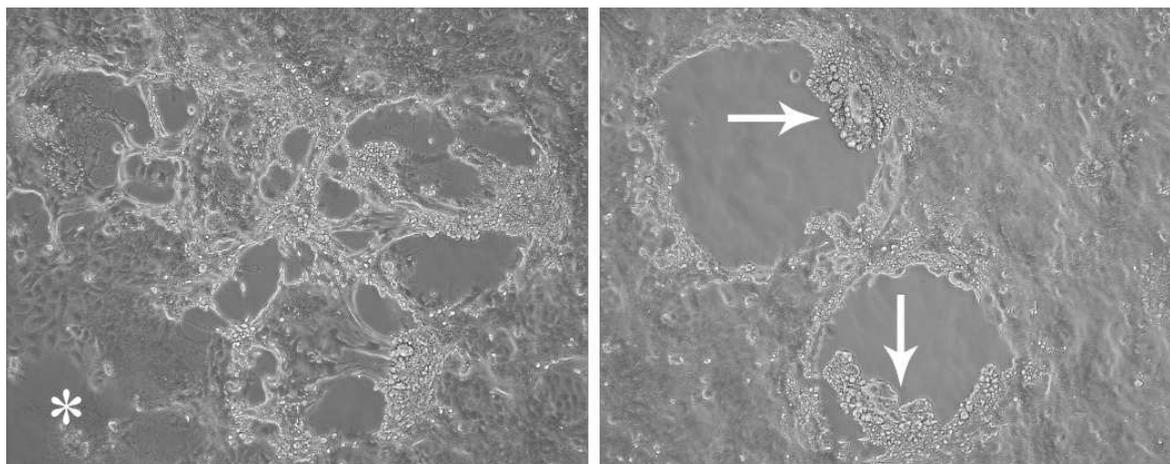


Abb. 4-17: rMV323 M-TC - Infektion von Vero SLAM-Zellen. Vero SLAM-Zellen wurden mit rMV323 M-TC (MOI 0.05) für 2 Tage infiziert. Die Plaques (*) und Blasen-formenden Plaques (->) sind gekennzeichnet. Die Mikroskop-Bilder zeigen die Zellen in einer 10x Auflösung.

Um die FLAsH-Färbung des TC-Tags in DCs zu testen, wurde DCs mit rMV323 M-TC für 2 h infiziert (MOI 2) und in FIP-haltigem Medium kultiviert. Als Folge der niedrigen Virustiter mussten die DCs mit großen Volumina der Virusüberstände infiziert werden. 24 h nach der Infektion wurden die Zellen mit FLAsH gefärbt und im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Kontrollzellen (Mock) zeigten eine schwache, unspezifische Hintergrundfärbung. Die Färbung infizierter DCs war stark und ausgeprägte FLAsH-Muster konnten visualisiert werden, die der Färbung in transfizierten DCs glichen und M-Protein-Aggregate sein könnten. Auffallend war, dass nur wenige DCs in der infizierten Fraktion dieses FLAsH-Muster zeigten, ein Indiz dafür, dass nur wenige Zellen infiziert waren. Das schnelle Ausbleichen der FLAsH-Fluoreszenz erschwerte die Auswertung der infizierten Zellen.

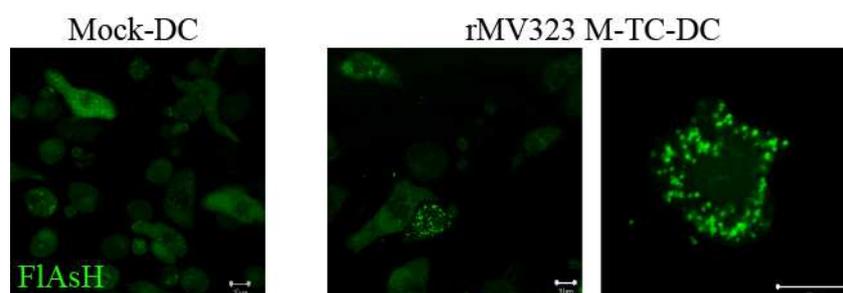


Abb. 4-18: FLAsH-Färbung rMV323 M-TC infizierter DCs 24 h p.I. DCs wurden mit rMV323 M-TC (MOI 2) für 24 h infiziert, mit FLAsH gefärbt und anschließend im Fluoreszenzmikroskop analysiert.

Das rekombinante M323-TC – Protein konnte mit Antikörpern, FLAsH und ReAsH in transfizierten HeLa-Zellen und DCs gefärbt werden und hatte alle untersuchten biologischen Eigenschaften des Wildtyp-Proteins. Innerhalb des Viruskontextes interferierte der TC-Tag allerdings offenbar so stark mit der Virusreplikation bzw. Freisetzung, dass für aussagekräftige

Experimente keine ausreichende Menge an Virus produziert werden konnte. Zusätzlich waren aufgrund der ausgeprägten `Bleaching-Effekte` keine Experimente zur dynamischen Verteilung und Relokalisation möglich.

4.3 Transmission des MV von DCs an autologe T-Zellen

CD150⁺ Lymphozyten und CD11c⁺ myeloide Zellen sind hauptsächlich die Zielzellen der MV-Infektion. Es wird angenommen, dass MV die DCs als Trojanisches Pferd benutzt, die den Transport von MV in sekundäre lymphatische Gewebe vermitteln, wo die Transmission zu CD150⁺ Lymphozyten stattfindet. Die Beobachtung, dass MV-DCs zusammen mit infizierten T-Zellen in Makaken (Tiermodell) vorkommen [1], unterstreicht diese Vermutung. Um die MV-Transmission von MV-DCs zu T-Zellen zu untersuchen und Komponenten und Strukturen zu entschlüsseln, die die Transmissionen ermöglichen, wurde ein autologes Zellsystem benutzt.

4.3.1 MV-Infektion von T-Zellen ist abhängig von der CD150-Oberflächenexpression

Für die Transmissionsexperimente wurden unstimulierte oder präaktivierte autologe T-Zellen eingesetzt. Zwei Stimulationsprotokolle wurden verwendet: T-Zellen wurde entweder mit PMA, das die signaltransduzierende Proteinkinase C (PKC) aktiviert, und Ionomycin, das das intrazelluläre Calciumlevel erhöht, (P/I) stimuliert oder CD3 und CD28 wurden durch spezifische Primär- und Sekundärantikörper auf der Oberfläche von T-Zellen kreuzvernetzt. Die Aktivierung der T-Zellen wurde durch die Hochregulierung der CD25-Oberflächenexpression, die α -Kette des IL-2 Rezeptors, im Durchflusszytometer kontrolliert. Parallel regulierten die aktivierten T-Zellen den MV-Eintrittsrezeptor CD150 auf der Oberfläche nach oben (Abb. 4-19A). Um die Effizienz der MV-Infektion der aktivierten T-Zellen *in vitro* zu bestimmen, wurden T-Zellen für 2 h mit IC323-GFP infiziert (MOI 1) und in FIP-haltigem Medium 3 Tage kultiviert. Die T-Zellen wurden geerntet und die Frequenz GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen wurde im Durchflusszytometer analysiert. Die MV-Infektion korrelierte mit dem Niveau der CD150-Oberflächenexpression.

Ergebnisse

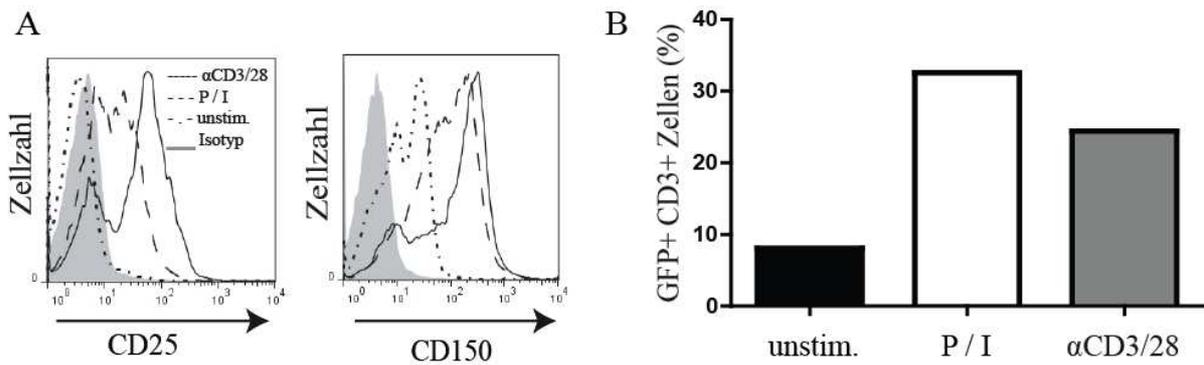


Abb. 4-19: Charakterisierung der aktivierten T-Zellen – erhöhte CD25 und CD150 Expression und effiziente MV-Infektion. (A) Nach 2 Tagen Stimulation wurden unstimulierte, P/I- und α CD3/28-stimulierte T-Zellen mit CD25- und CD150 (Klon: IPO3)-spezifischen Antikörpern gefärbt und im Durchflusszytometer analysiert. (B) T-Zellen wurden für 2 h mit MV IC323-GFP (MOI 1) infiziert. Nach 3 Tagen Kultivierung in FIP-haltigem Medium wurde die Frequenz infizierter Zellen bestimmt.

4.3.2 Effiziente MV-Transmission durch DC-vermittelte *cis*-Infektion

Die Virus-Dissemination kann entweder durch zellfreie oder zellassoziierte Infektion erfolgen. Für HIV-1 ist bekannt, dass die zellassoziierte Infektion von T-Zellen deutlich effizienter ist als die zellfreie Virus-Infektion [97]. Die zellassoziierte Infektion kann entweder durch DCs erfolgen, die das Virus 'trappen', in besonderen *storage*-Kompartimenten invaginieren und akkumulieren und dabei nicht infiziert werden (*trans*-Infektion), oder durch infizierte DCs, die *de novo* Virionen produzieren (*cis*-Infektion) [142]. Zuerst sollte untersucht werden, ob DCs mit MV beladen werden können und wo DCs MV intrazellulär lagern. Dafür wurden DCs mit UV-inaktivierten MV exponiert (MOI 5), nach 24 und 48 h auf PLL-beschichteten Objektträgern ausgesät und anschließend mit H-Protein-spezifischen Antikörpern gefärbt und fixiert. Zusätzlich wurde die Oberfläche der DC mit F-Aktin bindenden Phalloidin visualisiert. MV H-Proteine konnten auf der Oberfläche von DCs nach 24 und nach 48 h Infektion nachgewiesen werden. DCs können MV mithilfe des Anheftungsrezeptors DC-SIGN auf der Oberfläche *trappen* und konzentrieren, um dieses möglicherweise auf T-Zellen zu übertragen (*trans*-Infektion) [20].

Ergebnisse

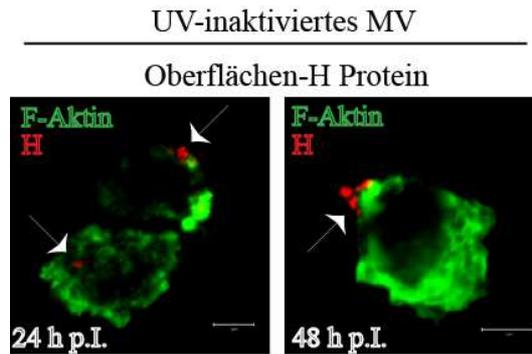


Abb. 4-20: Trapping von UV-inaktivierten MV auf der DC Oberfläche. DCs wurden für 24 und 48 h mit UV-inaktivierten MV (MOI 5) exponiert. Das oberflächenständige H-Protein wurde mit spezifischen Antikörpern gefärbt, danach wurden die Zellen fixiert und mit Phalloidin-A488 gefärbt.

Experimente in HIV *cis*-infizierten und HIV-beladenen DCs hatten gezeigt, dass ein Teil der Viren in Kompartimenten vorlagen, die von der Oberfläche zugänglich waren. Ihre Bedeutung wird durch die Tatsache unterstrichen, dass sie zur Kontaktstelle mit autologen T-Zellen polarisierten und somit zur Virus-Transmission beitragen [118, 119]. Um die Verteilung von MV-Proteinen in Kompartimenten, die von der Oberfläche zugänglich sind, zu untersuchen, wurden MV-DCs 24 h nach Infektion mit membranimpermeablen HRP (*horse-radish peroxidase*) unter nicht-endozytotischen Bedingungen bei 4°C inkubiert. Nach 1 h wurden die DCs mehrmals gewaschen, auf PLL-beschichteten Objektträgern ausgesät und mit Antikörpern gegen H- oder M-Protein zusammen mit HRP-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Färbungen zeigten, dass das H-Protein stark ($R_r = 0.86$) und das M-Protein partiell ($R_r = 0.66$) mit HRP^+ -Kompartimenten assoziierte. DCs akkumulierten virale Proteine in HRP^+ , Oberflächen-zugänglichen Kompartimente, die als Lagerstellen für 'getrapptes' MV oder als Orte der Partikelmorphogenese dienen könnten.

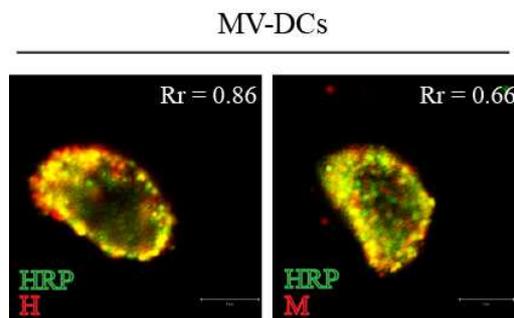


Abb. 4-21: Lokalisation von MV H- und M-Proteinen in HRP-zugänglichen Kompartimenten. MV-DCs wurden auf PLL-beschichteten Objektträger ausgesät, mit HRP bei 4°C für 1 h inkubiert, gewaschen, fixiert und mit H- bzw. M- und HRP-spezifischen Antikörpern gefärbt, im IF-Mikroskop analysiert und mithilfe des Pearson Koeffizienten (R_r) von Image J quantifiziert.

Ergebnisse

DCs können sowohl mit MV beladen, aber auch infiziert werden und neue Partikel produzieren. Für die MV-Dissemination sind DCs entscheidend, weil sie MV auf T-Zellen entweder durch zellassoziierte *cis*- oder *trans*-Infektion übertragen können. Allerdings kann auch zellfreies MV T-Zellen *in vitro* infizieren. Um die Effizienz der zellfreien und zellassoziierten Infektion der T-Zellen vergleichend zu analysieren, wurden unstimulierte, P/I- oder α CD3/28-stimulierte T-Zellen mit MV IC323-GFP exponiert (zellfreie Infektion), MV), DCs für 2 h mit MV IC323-GFP beladen (*trans*-MV-DCs) [20] oder DCs für 24 h mit MV IC323-GFP infiziert (*cis*-MV-DCs) und diese mit unstimulierten oder stimulierten T-Zellen für 2 h im Verhältnis 1:4 kokultiviert. Anschließend wurde das Medium gewechselt und die Zellen wurden weitere 3 Tage in FIP-haltigem Medium kultiviert. Die Frequenz MV-infizierter GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen wurde im Durchflusszytometer bestimmt. Mock-DC / T-Zell-Kokulturen wiesen weniger als 0.8 % GFP⁺-T-Zellen auf. Unabhängig von der Art der Aktivierung der T-Zellen, war die *cis*-Infektion doppelt so effizient wie die beiden anderen Infektionsarten. Die Frequenz GFP⁺-Zellen war kleiner als 18 %, währenddessen 52 % bzw. 36 % der CD3⁺ P/I-aktivierten und α CD3/28-aktivierten T-Zellen GFP⁺ waren. Die *trans*-Infektion war nur geringfügig effizienter als die zellfreie Infektion der T-Zellen (Abb. 4-22).

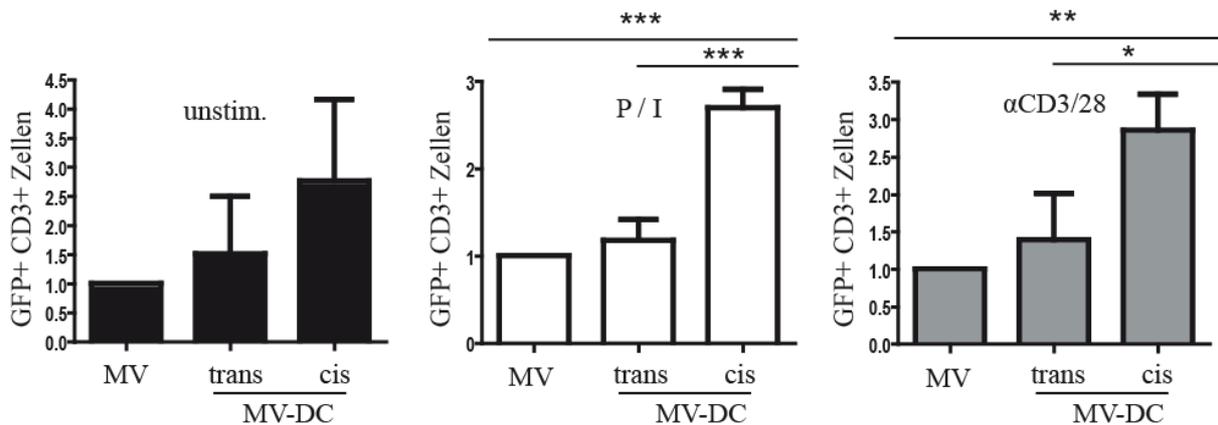


Abb. 4-22: MV *cis*-Infektion von T-Zellen ist am effizientesten. Für die *trans*- oder *cis*-MV Transmission wurden DCs entweder mit MV IC323-GFP für 2 h beladen und für 24 h infiziert und mit unstimulierten oder stimulierten T-Zellen für 2 h im Verhältnis 1:4 kokultiviert. Zusätzlich wurden T-Zellen mit MV IC323-GFP infiziert. Danach wurde FIP zugegeben und 3 Tage später die Frequenz GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten (jedes wurde in Duplikaten durchgeführt) sind mit Fehlerbalken, die die Standardabweichung repräsentieren, dargestellt. Die Frequenz GFP⁺/CD3⁺-T-Zellen wurde entsprechend der zellfreien Infektion (MV) normalisiert. Statistische Unterschiede wurden mithilfe von *one-way* ANOVA und folgendem Bonferroni *post-testing* errechnet (Prism software), **p*<0.05, ***p*<0.01 und ****p*<0.001.

Um die Kinetik der MV *cis*-Infektion zu bestimmen, wurde nach 15, 30, 60 und 120 min FIP zu den MV-DC / T-Zell-Kokulturen zugegeben und so die weitere MV-Transmission unterbunden. Die Analyse der Kinetik zeigte, dass stimulationsunabhängig nach 15 min bereits

Ergebnisse

etwa 50 % aller GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen infiziert waren. Die Frequenz infizierter T-Zellen stieg innerhalb der 120 minütigen Transmission an (Abb. 4-23).

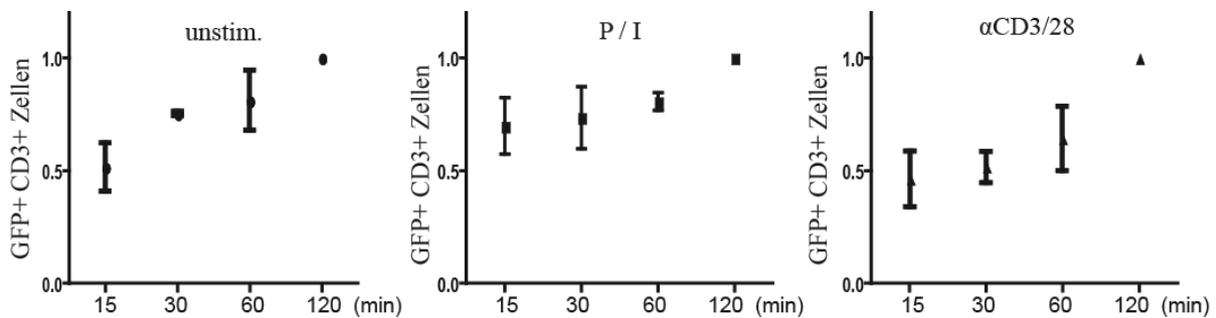


Abb. 4-23: Kinetik der MV *cis*-Infektion von T-Zellen. MV-DCs wurden im Verhältnis 1:4 mit unstimulierten oder stimulierten T-Zellen für 15, 30, 60 oder 120 min kokultiviert. Nach 3 Tagen Kultivierung in FIP-haltigem Medium wurde die Frequenz GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten (jedes wurde in Duplikaten durchgeführt) sind mit Fehlerbalken, die die Standardabweichung repräsentieren, dargestellt. Die Frequenz GFP⁺/CD3⁺-T-Zellen wurde entsprechend dem 120 min Wert normalisiert.

Die zeitabhängige Transmission ist am effizientesten von *cis*-MV-DCs an präaktivierte T-Zellen, die Oberflächen-CD150 exprimierten. Aus diesem Grund wurden die präaktivierten T-Zellen für weitere Transmissionsexperimente verwendet.

4.3.3 Die Abhängigkeit der MV-Transmission von MV-Glykoproteinen und CD150 auf der T-Zelle

Die HIV-Transmission von Zelle zu Zelle ist abhängig von der Ausbildung einer Virologischen Synapse (VS), in der die HIV-Glykoproteine und Rezeptoren akkumulieren [103]. Die Interaktion des MV mit seinem Rezeptor könnte eine essentielle Rolle für die *cis*-Infektion von T-Zellen spielen. Die Aktivierung von T-Zellen mit P/I und α CD3/CD28 steigert die CD150-Oberflächenexpression (Abb. 4-19A). Um die Bedeutung der MV Rezeptor-Interaktion in der *cis* MV-DC-vermittelten Transmission zu untersuchen, wurde CD150 auf der T-Zelle durch die Präinkubation mit spezifischen Antikörpern blockiert. Als Kontrolle wurden T-Zellen mit einem Isotyp-spezifischen Antikörper (iso) inkubiert. Die Frequenz GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen und damit die Effizienz der Transmission wurde durch die CD150-Blockierung signifikant beeinträchtigt (Abb. 4-24A). Die CD150-Oberflächenexpression auf MV-DCs ist deutlich geringer als auf mDCs (Abb. 4-4). Um zu untersuchen, ob die homotypische CD150-CD150-Interaktion einen Einfluss auf die Transmission hat, wurden die MV-

Ergebnisse

DCs vor Initiation der Kokultur mit CD150-blockierenden Antikörpern inkubiert. Die CD150-Blockierung auf DCs hatte keinen Einfluss auf die Effizienz der Transmission (Abb. 4-24B).

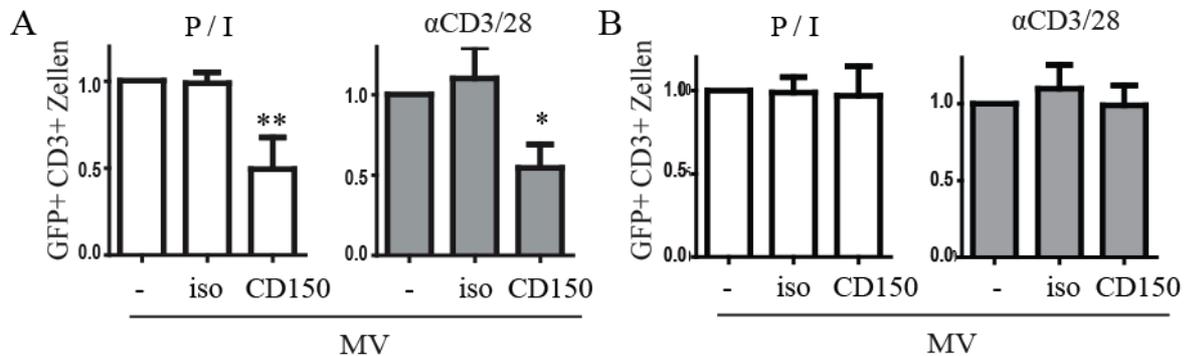


Abb. 4-24: MV Transmission ist abhängig von CD150-exprimierenden T-Zellen, jedoch nicht von CD150 auf MV-DCs. T-Zellen (A) oder MV-DCs (B) wurden vor der Transmission für 1 h mit 100 μ g/ml CD150-spezifischen Antikörper (5C6) oder Isotyp (I1) (iso)-Kontrolle inkubiert und gewaschen. Die Frequenz GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen wurde 3 Tage später im Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten (in Duplikaten) mit Fehlerbalken, die die Standardabweichung repräsentieren, sind dargestellt. Die Frequenz GFP⁺/CD3⁺-T-Zellen wurde entsprechend der unbehandelten Zellen normalisiert. Statistische Unterschiede wurden mithilfe *one-way* ANOVA und folgendem Bonferroni *post-testing* errechnet (Prism software), **p*<0.05, ***p*<0.01 und ****p*<0.001.

Das MV H-Protein bindet mit hoher Affinität an CD150 [33]. Um die Bedeutung der Oberflächenexpression von MV H-Proteinen für die MV-Transmission zu untersuchen, wurden DCs mit zwei Glykoprotein H-spezifischen Antikörpern (Klon L77 = H1, NC32 = H2), die verschiedene Epitope erkennen [143], inkubiert und für Transmissionsexperimente verwendet. Die Präinkubation von MV-DCs mit einem H-Protein-spezifischen Antikörper reduzierte die Frequenz GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen um 30 % im Vergleich zu den unbehandelten MV-DCs. Die Präinkubation der MV-DCs mit H1+H2-Antikörpern hatte einen additiven Effekt und reduzierte die Transmission um 50 % (Abb. 4-25).

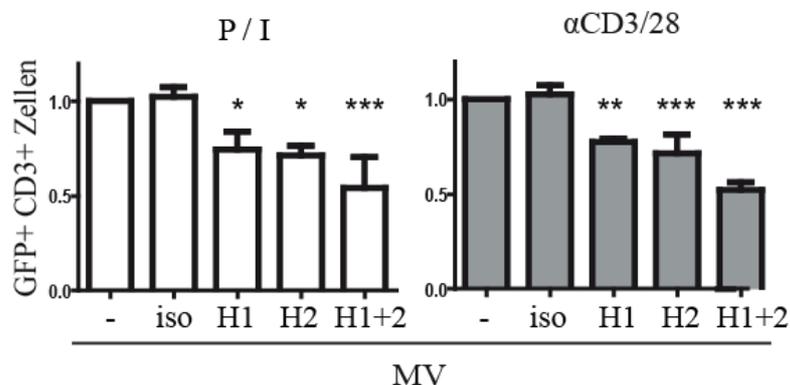


Abb. 4-25: MV-Transmission ist abhängig von zugänglichem MV H-Protein. MV-DCs wurden mit 100 μ g/ml H-Protein-spezifischen Antikörpern (L77-H1, NC32-H2, L77+NC32-H1+H2) für 1 h inkubiert und gewaschen und mit T-Zellen kokultiviert. Die Frequenz GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen wurde im Durchflusszytometer analysiert. Die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten (in Duplikaten) mit Fehlerbalken, die die Standardab-

Ergebnisse

weichung repräsentieren, sind dargestellt. Die Frequenz GFP⁺/CD3⁺-T-Zellen wurde entsprechend der unbehandelten Zellen normalisiert. Statistische Unterschiede wurden mithilfe *one-way* ANOVA und Bonferroni *post-testing* errechnet (Prism software), **p*<0.05, ***p*<0.01 und ****p*<0.001.

4.3.4 MV-DCs bilden Polykonjugate mit stimulierten T-Zellen

Die Virustransmission kann nicht nur über einzelne Zell-Zell-Kontakte erfolgen, sondern, wie für HIV gezeigt wurde, auch über die virusinduzierte Ausbildung von rosettenartigen Polysynapsen, die die Ausbreitung von HIV verstärken [112]. Um die Anzahl konjugierter T-Zellen pro MV-DCs zu bestimmen, wurden IC323-GFP infizierte DCs (5×10^4) auf PLL-beschichteten Objektträgern ausgesät. Nach 30 min wurden R18-markierte T-Zellen (2×10^5) im Verhältnis 1:4 zugegeben und nach 1 h Inkubationszeit fixiert. Die Konjugate wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert. Die Konjugationsfrequenz unstimulierter T-Zellen mit Mock-DCs und MV-DCs war vergleichbar mit jeweils 1.7 unstimulierte T-Zellen pro MV-DC. Hingegen konnte gezeigt werden, dass präaktivierte T-Zellen häufiger Polysynapsen mit MV-DCs im Vergleich zu Mock-DCs und im Vergleich zu Konjugaten mit unstimulierten T-Zellen - 3 P/I pro MV-DC und 2.8 α CD3/28 pro MV-DC (Abb. 4-26) ausbilden. Die höhere Frequenz von Polykonjugaten steigerte die Anzahl potenzieller Transmissionsstellen und damit die Transmission selbst.

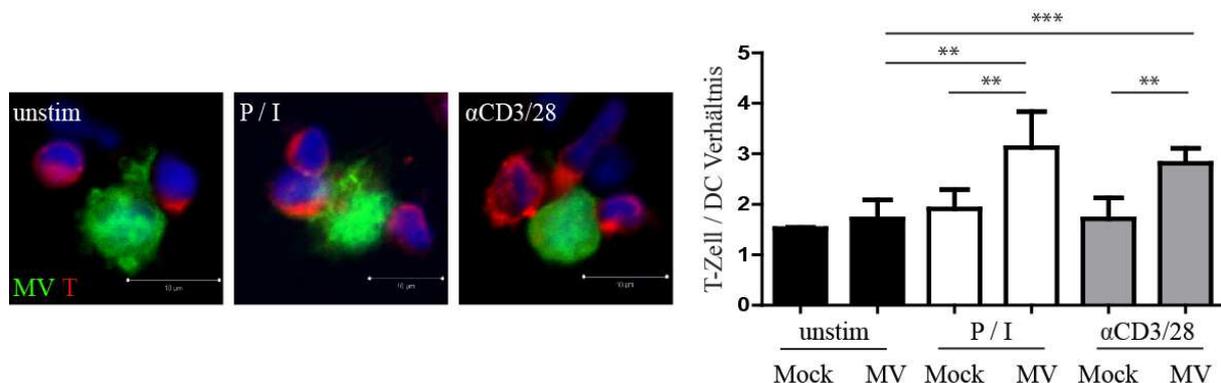


Abb. 4-26: Ausbildung von Polykonjugaten mit präaktivierten T-Zellen. WGA-gefärbte Mock-DCs oder MV IC323-GFP DCs wurden auf PLL-beschichteten Objektträgern ausgesät. R18-gefärbte T-Zellen wurden im Verhältnis 1:4 zugegeben und nach 1 h Inkubation fixiert. Der Zellkern wurde mit DRAQ5 visualisiert. 1 Ansatz (50 DCs) und 4 Ansätze (20 DCs) wurden im Fluoreszenzmikroskop ausgewertet und die Anzahl konjugierter T-Zellen / DCs bestimmt. Statistische Unterschiede wurden mithilfe des Student's T-Test errechnet (GraphPad Prism software), **p*<0.05, ***p*<0.01, und ****p*<0.001.

Ergebnisse

4.3.5 Abhängigkeit der MV-Transmission von Zell-Zell-Kontakten

Die Ausbildung einer VS ist gekennzeichnet durch die Akkumulation viraler Proteine, Rezeptoren und F-Aktin [103]. Die Umverteilung des F-Aktins in der Zielzelle ist zudem wichtig für die HIV-Transmission [144]. Um zu untersuchen, ob F-Aktin an den Kontaktflächen, die von der MV WTF-infizierten DC und einer präaktivierten T-Zelle gebildet werden, akkumuliert, wurden Konjugate auf PLL-Objektträger gebildet, fixiert sowie mit Phalloidin, das F-Aktin bindet, und H-Protein spezifischen Antikörpern gefärbt. MV H-Protein und Phalloidin akkumulieren an der Kontaktfläche der Konjugate. Die F-Aktin-Fluoreszenz ist zusätzlich zur Verdeutlichung der Intensitäten als Falsch-Farben-Intensitätsbild dargestellt. Die Umverteilung des F-Aktins ist statistisch nicht signifikant, allerdings ist eine tendenzielle Akkumulation an der Synapse erkennbar (Abb. 4-27A). Zusätzlich konnte unabhängig von T-Zell-Präaktivierungen das MV H-Protein in aktinreichen Fortsätzen detektiert werden (Abb. 4-27B), die bereits für HIV beschrieben wurden [124]. Aufgrund des seltenen Auftretens dieser Filopodienbrücken, wird davon ausgegangen, dass die MV-Transmission hauptsächlich über Zell-Zell-Kontakt verläuft.

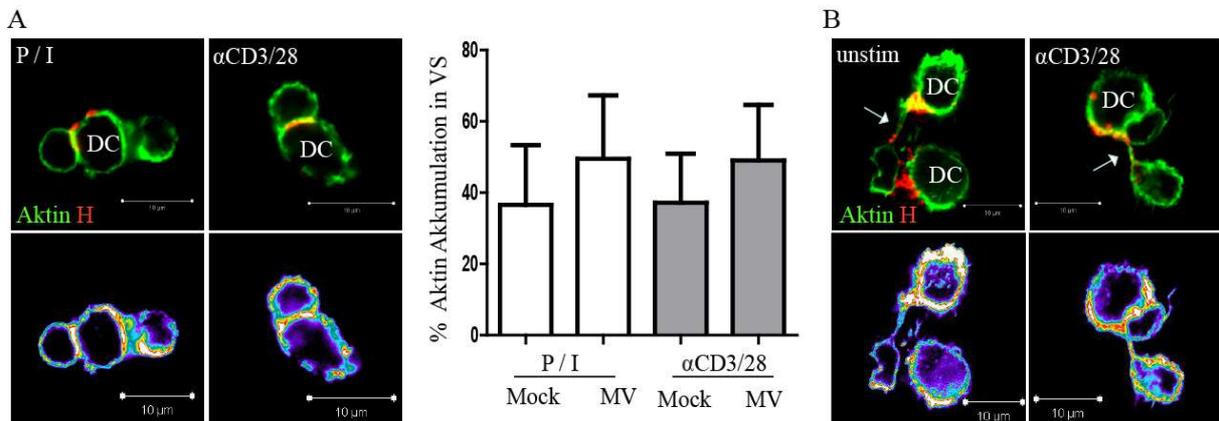


Abb. 4-27: MV-Transmission erfolgt über Zell-Zell-Kontakte und seltener über aktinreiche Brücken. Konjugate zwischen WTF-DCs und T-Zellen, die auf PLL-beschichteten Objektträgern ausgesät wurden, sind mit Phalloidin-A488 und anti-MV H spezifischen Antikörpern (K83) gefärbt wurden. Die Konjugate wurden mit dem Fluoreszenzmikroskop ausgewertet. Die Quantifizierung erfolgte mit AIDA Image Analyzer und statistische Unterschiede wurden mithilfe des Student's T-Test (GraphPad Prism) errechnet.

4.3.6 MV-Proteine akkumulieren in der MV-induzierten VS

Um die Verteilung von CD150, MV Proteine und anderer Moleküle in der VS zu untersuchen, wurden DC mit MV IC323-GFP infiziert und Mock-DCs mit WGA gefärbt. 24 h nach Infektion adhären DCs (5×10^4) auf PLL-beschichteten Objektträgern und nach 30 min wurden

Ergebnisse

T-Zellen (2×10^5 , im Verhältnis 1:4) zugegeben. Nach 1 h Inkubation wurden die Zellen fixiert und entsprechend gefärbt. Pro Experiment wurden mindestens 20 Konjugate im Fluoreszenz-Mikroskop analysiert und mithilfe von Image J quantifiziert. Die statistischen Unterschiede wurden durch den Student's T-Test berechnet.

Die MV-Transmissionsexperimente zeigten die Bedeutung von zugänglichen CD150 und MV Glykoprotein H auf der Zelloberfläche für die Transmission. Um die Verteilung von MV-Proteinen an der Kontaktstelle von MV-DCs und präaktivierten T-Zellen zu untersuchen, wurden Konjugate gebildet, mit MV H- und P-Protein-spezifischen Antikörpern gefärbt und analysiert. Die Quantifizierung zeigte, dass im Mittel 52 % bzw. 54 % des H-Proteins, das in nicht konjugierten MV-DCs in Clustern auf die Oberfläche verteilt war (Abb. 4-9), in Konjugaten mit P/I bzw. α CD3/28-T-Zellen effizient in die VS rekrutiert wurde und diese der Ort der Transmission sein könnte. Um dieses Transmissionskompartiment näher zu beschreiben, wurde zusätzlich das Phosphoprotein P gefärbt, das eine repräsentative Komponente des RNP-Komplexes ist, in unkonjugierten MV-DCs hauptsächlich intrazellulär verteilt (Abb. 4-9) und nicht mit dem H-Protein assoziiert ist ($R_r = 0.42$). Die Fluoreszenzfärbung zeigte, dass 52 % bzw. 46 % des P-Proteins in der VS konzentriert ist. Das gemeinsame Vorkommen von H- und P-Proteinen deutet darauf hin, dass virale Partikel in der VS akkumulieren könnten.

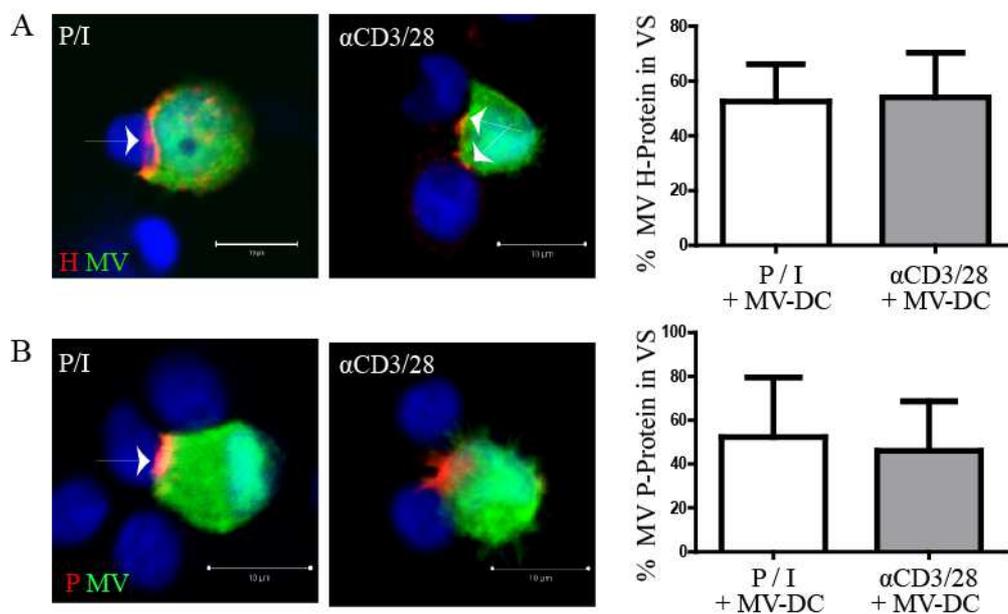


Abb. 4-28: MV H- und P-Protein-Umverteilung zur VS. MV-DC / T-Zelle-Konjugate wurden mit spezifischen H-Protein Antikörpern (A) und anti-P-Protein Serum (B) gefärbt. Die Konjugate wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Proteinverteilung mithilfe von AIDA Image Analyzer quantifiziert.

Ergebnisse

Der MV-Eintritt in die Zielzelle wird durch MV H-Protein und CD150-Interaktion initiiert. Deshalb wurde zunächst die Lokalisation von CD150 in den Konjugaten untersucht. In MV-DC / T-Zell-Konjugaten war eine Akkumulation von CD150 zu erkennen, die MV-spezifisch war. Nur 29 % der CD150-Gesamtmenge konzentrierte sich an der Kontaktstelle zwischen Mock-DC / P/I-T-Zelle, jedoch 49 %, wenn die DC infiziert war (Abb. 4-29A). MV-DCs exprimieren deutlich weniger CD150 als mDC, jedoch war das Oberflächenniveau marginal auf MV-DCs erhöht (Abb. 4-4). Zusätzlich hatte die CD150 Blockierung auf DCs keinen Einfluss auf die MV-Transmission gezeigt (Abb. 4-24 B). Um zu testen, ob das in VS-konzentrierte CD150 in T-Zellen spezifisch zur VS rekrutiert wird, wurden T-Zellen mit einem CD150-HA-kodierenden Plasmid mit Amaxa® transfiziert. 24 h nach der Transfektion wurden Konjugate gebildet und die Lokalisation mittels HA-spezifischer Antikörper detektiert. Die Quantifizierung zeigte auf, dass 62 % des CD150-HA Proteins in der VS relokalisieren (Abb. 4-29B). Die MV-Transmission von MV-DCs zu T-Zellen involviert die Konzentration von viralen Proteinen und CD150 in der VS.

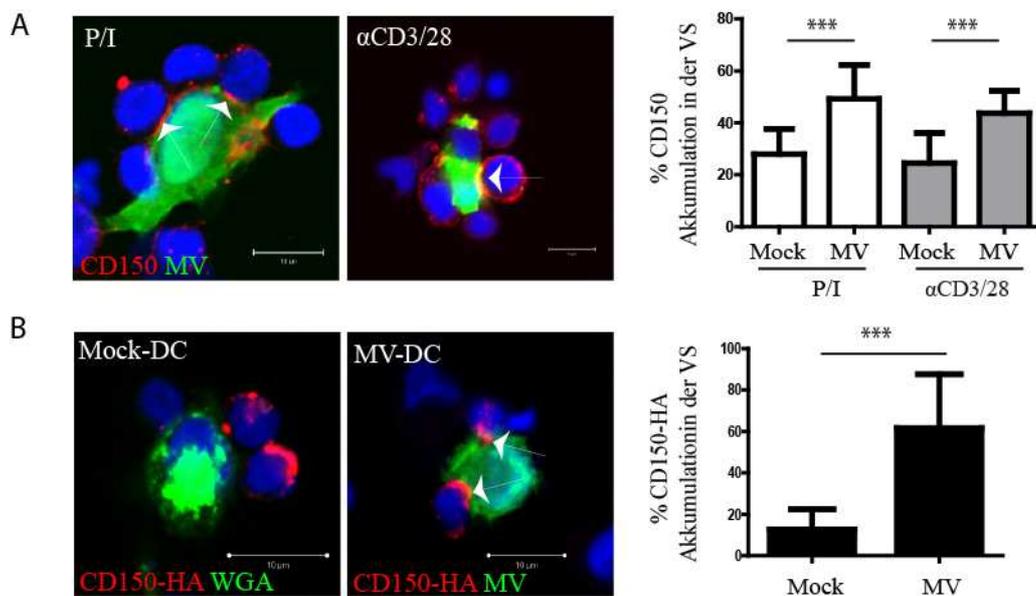


Abb. 4-29: CD150-Akkumulation in der VS. MV-DCs / T-Zellen-Konjugate (A) oder MV-DCs / CD150-HA-exprimierende T-Zellen, die 24 h vorher transfiziert wurden, sind mit CD150 (IPO3)- oder HA-spezifischen Antikörpern gefärbt wurden. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 visualisiert. Die Konjugate wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Proteinverteilung mithilfe von AIDA Image Analyzer quantifiziert. Statistische Unterschiede wurden unter Anwendung des Student's T-Test errechnet (GraphPad Prism software), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$.

Ergebnisse

4.3.7 CD150-Umverteilung in die VS ist aktinabhängig

Experimente mit HIV zeigten, dass das Glykoprotein Env-induzierte CD4-Clustern auf der Zielzellenoberfläche abhängig von der Dynamik des Zytoskeletts ist [103]. Um die Bedeutung des Zytoskeletts zu untersuchen, wurden CD150-HA exprimierende T-Zellen 1 h mit Latrunculin B (LatB), ein Inhibitor des Aktinzytoskeletts, oder mit Nocodazol (Noco), ein Inhibitor der Mikrotubuli, inkubiert, bevor sie mit den MV-DCs kokultiviert wurden. In Noco-vorbehandelten unstimulierten T-Zellen konnte eine schwache Reduktion der CD150-HA-Verteilung von 53 % beobachtet werden. Die Umverteilung von CD150-HA zur VS war in transfizierten, Noco-vorbehandelten P/I T-Zellen auch beeinträchtigt, allerdings war die beobachtete Reduktion deutlich geringer und betrug 27 % (Abb. 4-30 / Tabelle 4-2). Im Gegensatz dazu zeigte die Vorbehandlung von T-Zellen mit LatB eine deutliche Reduktion der CD150-HA Polarisierung zur MV-VS. Vergleichbar mit Mock-DCs, akkumulierte nur 13 % der Gesamtmenge an CD150-HA in der MV-VS. Die Umverteilung von CD150-HA wurde deutlich um 79 % inhibiert. Dieselbe Beobachtung konnte in Konjugaten mit P/I-präaktivierten T-Zellen gemacht werden, wo die CD150-HA Umverteilung um 73 % reduziert war. Die zelluläre Umverteilung des MV-Eintrittsrezeptors in die MV-VS ist aktinabhängig.

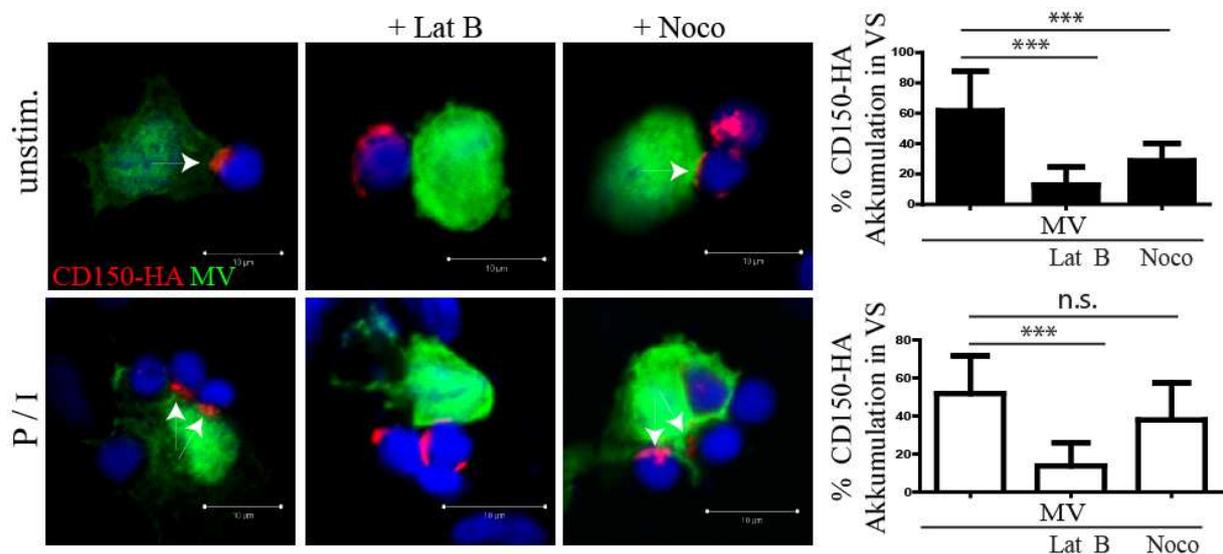


Abb. 4-30: Verteilung von CD150-HA an die Kontaktstelle ist aktinabhängig. Transfizierte unstimulierte oder P/I-stimulierte T-Zellen wurden entweder mit 2.5 μ M Latrunculin B (LatB) oder 1 μ M Nocodazol (Noco) für 1 h vorinkubiert. Die Konjugate wurden mit HA-spezifischen Antikörpern gefärbt und die Zellkerne mit DRAQ5 visualisiert. Anschließend wurden die Konjugate im Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Proteinverteilung mittels AIDA Image Analyzer quantifiziert. Statistische Unterschiede wurden mithilfe des Student's T-Test errechnet (GraphPad Prism software), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, und *** $p < 0.001$.

Ergebnisse

CD150-HA Konzentration in der VS im Vergleich zu unbehandelten Zellen					
	Unstim. T-Zellen			P/I T-Zellen	
-	Lat B	Noco	-	Lat B	Noco
100 %	21 %	47 %	100 %	27 %	73 %

Tabelle 4-2: Einfluss von Zytoskelett-Inhibitoren auf die Akkumulation von CD150-HA in der VS. Die Menge von VS-konzentrierten CD150-HA wurde in unbehandelten Zellen gleich 100 % gesetzt.

4.3.8 Polarisation von ICAM-1, Integrin LFA-1, MV-Korezeptoren DC-SIGN und Substanz P Rezeptor (SPR) zur VS

Die Interaktion von ICAM-1 und LFA-1 stabilisiert die HIV-VS. Die DC-vermittelte Transmission war signifikant reduziert, wenn ICAM-1 auf DCs und LFA-1 auf T-Zellen blockiert wurde [121]. Nur aktiviertes LFA-1 bindet an seinen Rezeptor ICAM-1 [145]. Die Aktivierung von LFA-1 resultiert aus dem TCR-pMHC Komplex oder der TCR-HIV gp 120 Interaktion [146, 147].

Um die Bedeutung von ICAM-1 für die MV-Transmission zu bestimmen, wurde die Lokalisation von ICAM-1 in MV-DC / T-Zell-Konjugaten analysiert. In den Konjugaten konnte eine signifikante Polarisierung von ICAM-1 zur Kontaktstelle beobachtet werden, wobei 44 % der Gesamtmenge von ICAM-1 in Konjugaten mit voraktivierten P/I T-Zellen bzw. 47 % in Konjugaten mit α CD3/28 T-Zellen in der VS akkumulierten (Abb. 4-31A).

Um das aktivierte LFA-1 zu detektieren, wurde der monoklonale Antikörper NKI-L16 benutzt, der die aktive LFA-1 α -Untereinheit detektiert [148]. Die Akkumulation von aktiviertem LFA-1 war MV spezifisch und etwa 41 % (P/I) bzw. 46 % (α CD3/28) der Gesamtmenge an LFA-1 konzentrierten sich in der VS (Abb. 4-31B).

Ergebnisse

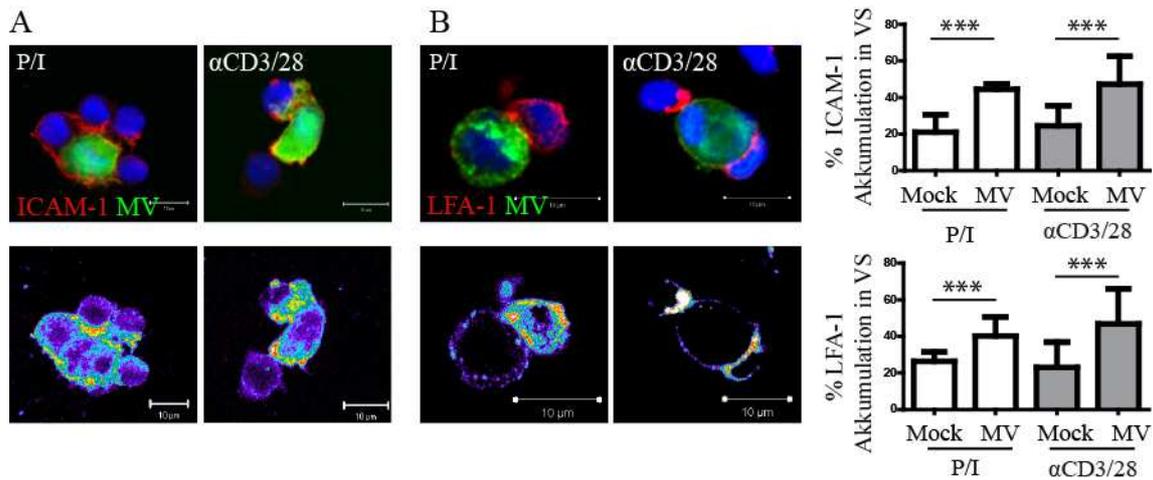


Abb. 4-31: ICAM-1 und aktiviertes LFA-1 polarisieren zur VS. (A) MV-DC / T-Zell-Konjugate wurden mit ICAM-1 (Rek-1)-spezifischen Antikörpern gefärbt. (B) 10 μ g/ml LFA-1 spezifischer Antikörper (NKI-L16 in 1% BSA + 1mM CaCl₂) wurden vor der Fixierung der Zellen für 1 h auf Eis inkubiert. Danach wurden die Zellen gewaschen, fixiert und mit dem entsprechenden Zweitantikörper gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 visualisiert. Die Konjugate wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Proteinverteilung mithilfe von AIDA Image Analyzer quantifiziert. Statistische Unterschiede wurden mittels Student's T-Test errechnet (GraphPad Prism software), *p<0.05, **p<0.01 und ***p<0.001.

Das C-typ Lektin DC-SIGN ist ein Anheftungsrezeptor für HIV und MV. DC-SIGN fördert die Virusinfektion, aber auch den Virustransfer [20, 26, 149] sowie die Bildung der VS durch Aktivierung des *Rho Guanine Exchange Factor* (GEF) LARG [150] und Ausbildung von Fortsätzen durch die nachfolgende Aktivierung der *Rho guanosine-triphosphatases* (GTPase) Cdc42 [124]. Um zu testen, ob DC-SIGN in der VS akkumuliert, wie es für HIV beschrieben wurde [123], wurden Konjugate mit DC-SIGN-spezifischen Antikörpern gefärbt. 45 % der Gesamtmenge von DC-SIGN polarisierten spezifisch an der Konjugat-Kontaktstelle (Abb. 4-32A). Der Substanz P Rezeptor (SPR) (auch Neurokinin-1 Rezeptor (NK-1R) genannt) ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor für die Substanz P und besitzt sieben Transmembrandomänen. SPR unterstützt die MV-ZNS-Infektionen und Ausbreitung [151] und verbessert die MV-Infektion von T-Zellen [152]. Die Färbung von SPR in Konjugaten zeigte eine eher periphere Akkumulation in der VS als eine zentrale Lokalisation. Die Polarisierung ist signifikant für Konjugate mit MV-DCs. 35 % (P/I) bzw. 41 % (α CD3/28) der Gesamtmenge von SPR akkumulierten in der VS, die in MV-DC / T-Zell-Konjugaten gebildet wurde (Abb. 4-32B).

Ergebnisse

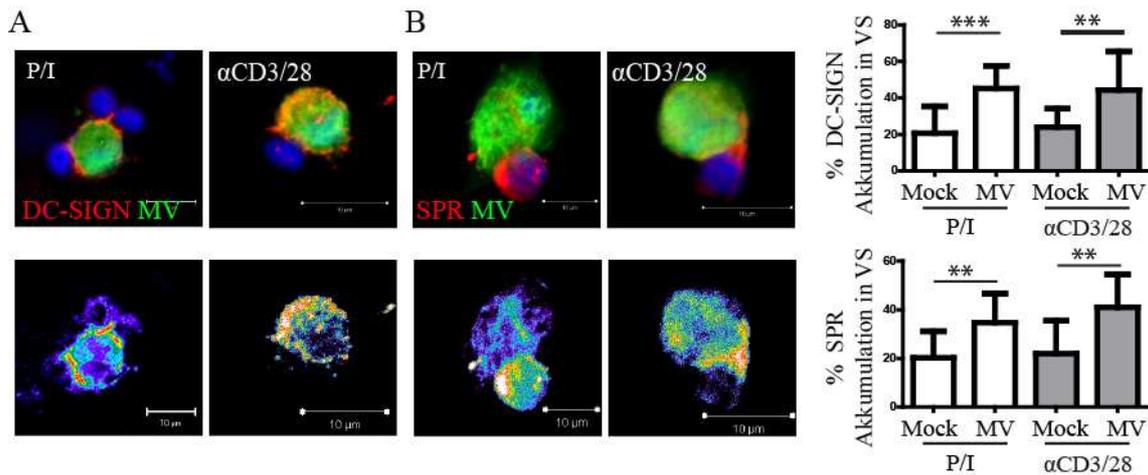


Abb. 4-32: DC-SIGN & Substanz P Rezeptor (SPR) clustern in der VS. MV-DC / T-Zell-Konjugate wurden mit (A) DC-SIGN (H200) – und (B) SPR - spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 visualisiert. Die Konjugate wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Proteinverteilung mittels AIDA Image Analyzer quantifiziert. Statistische Unterschiede wurden mithilfe des Student's T-Test errechnet (Graph-Pad Prism software), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$.

Die IF-Analysen zeigten, dass einige MV-Rezeptoren und Adhäsionsmoleküle innerhalb der VS polarisieren und möglicherweise zur Effizienz der Transmission beitragen.

4.3.9 CD81 ist ein Komponent der VS und seine Zugänglichkeit verbessert die MV-Transmission

CD81 (TAPA-1) ist ein Tetraspanin, das in HIV-infizierten DCs zur VS umverteilt wird [119]. Die Analyse der Lokalisation von CD81 in MV-induzierten VS ergab, dass 50 % der Gesamtmenge von CD81 in der VS lokalisieren (Abb. 4-33A). Um die funktionelle Bedeutung der Akkumulation von CD81 für die Transmission zu untersuchen, wurden MV-DCs 1 h mit CD81-spezifischen Antikörpern vorinkubiert und danach mit T-Zellen kokultiviert. Als Kontrolle wurden MV-DCs mit einem Isotypantikörper inkubiert. Nach 3 Tagen wurde die Frequenz GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer gemessen. Das Blocken von oberflächenständigem CD81 durch Antikörper reduzierte die MV-Transmission um 35 % (P/I) bzw. 26 % (α CD3/28) im Vergleich zur Kontrolle. Die Umverteilung von CD81 zur VS sowie die Zugänglichkeit von CD81 haben einen funktionellen Effekt auf die Transmission.

Ergebnisse

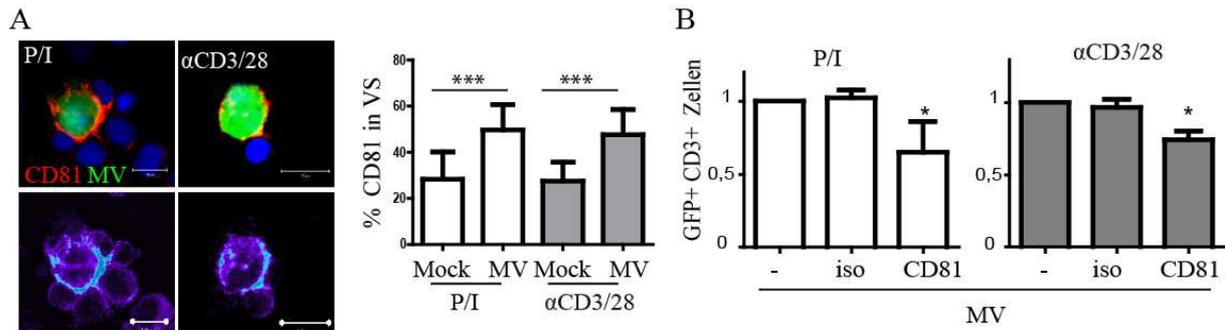


Abb. 4-33: CD81 akkumuliert in der VS und beeinflusst die MV-Transmissionseffizienz. (A) MV-DCs / T-Zell-Konjugate wurden mit CD81-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 visualisiert. Die Konjugate wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Proteinverteilung mithilfe von AIDA Image Analyzer quantifiziert. Statistische Unterschiede wurden unter Verwendung des Student's T-Test errechnet (GraphPad Prism software), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$. (B) MV-DCs wurden 1 h vor der Transmission mit 50 μ g/ml CD81-spezifischen Antikörper vorinkubiert. 3 Tage nach der Transmission wurde die Frequenz GFP⁺/CD3⁺ T-Zellen im Durchflusszytometer bestimmt. Die Mittelwerte von 3 unabhängigen Experimenten (in Duplikaten) mit Fehlerbalken, die die Standardabweichung repräsentieren, sind dargestellt. Die Frequenz der GFP⁺/CD3⁺-T-Zellen wurde entsprechend der unbehandelten Zellen normalisiert. Statistische Unterschiede wurden mithilfe *one-way* ANOVA und Bonferroni *post-testing* errechnet (Prism software), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$.

4.3.10 Moesin und pERM akkumulieren in der VS

Moesin (*membrane-organizing extension spike protein*) ist ein Mitglied der Ezrin-Radixin-Moesin (ERM) Proteinfamilie. ERM-Proteine ermöglichen die Verbindung zwischen membranassoziierten Proteinen und dem Aktinzytoskelett. Moesin, pERM und F-Aktin akkumulieren an der Kontaktstelle von HIV-infizierten und Zielzellen [153]. Außerdem wurde Moesin in Verbindung mit der Aufnahme des MV-Vakzinestammes durch physische Interaktion mit CD46 gebracht [154, 155]. Die Polarisierung von F-Aktin und der Verlust der VS-Rekrutierung von CD150 nach Inkubation mit Aktinzytoskelett-Inhibitoren (Abb. 4-29, 4-30) weisen auf eine Beteiligung von Moesin hin. Um die Verteilung von Moesin in der VS zu untersuchen, wurden die Konjugate gefärbt. Die Auswertung der IF zeigte, dass 50 % (P/I) bzw. 42 % (α CD3/28) von der Moesin-Gesamtmenge in der VS polarisierten (Abb. 4-34A). Phosphorylierte ERM (pERM)-Proteine sind aktiv und befähigt, F-Aktin mit der Plasmamembran zu verbinden. Um zu untersuchen, ob pERM an der VS konzentriert vorkommt, wurden die Konjugate gefärbt. 61 % (P/I) bzw. 54 % (α CD3/28) der pERMs akkumulierten signifikant in der MV-induzierten VS (Abb. 4-34B). Es konnte gezeigt werden, dass Aktindynamik-regulierende Proteine Moesin und pERM Komponenten der MV-VS sind.

Ergebnisse

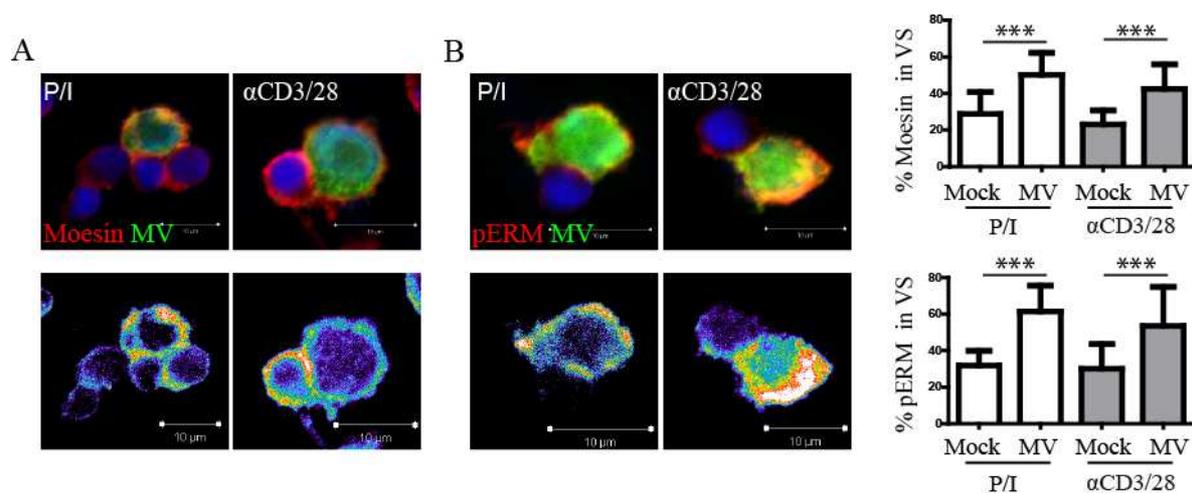


Abb. 4-34: Moesin und pERM sind Komponenten des VS. MV-DC / T-Zell-Konjugate wurden mit (A) Moesin- und (B) pERM-spezifischen Antikörpern gefärbt. Die Zellkerne wurden mit DRAQ5 visualisiert. Die Konjugate wurden im Fluoreszenzmikroskop analysiert und die Proteinverteilung mittels AIDA Image Analyzer quantifiziert. Statistische Unterschiede wurden mithilfe des Student's T-Test errechnet (GraphPad Prism software), * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$ und *** $p < 0.001$.

Die vorangegangenen Experimente haben gezeigt, dass die MV-VS wichtige Gemeinsamkeiten mit der HIV-VS teilt. In der MV-VS konzentrierten sich zelluläre Komponenten, die potentiell die Regulation der Aktindynamik, die Stabilität von Konjugate und damit den Eintritt des MV in die Ziel-T-Zelle unterstützen und einen Einfluss auf Membranfusionen haben könnten.

5 Diskussion

iDCs sind Wächter des Immunsystems, die eingedrungene Erreger aufspüren. Einige Erreger benutzen sie jedoch als Trojanische Pferde für den Transport in sekundäre lymphatische Gewebe, wo die Transmission an T-Zellen und die Dissemination des Erregers erfolgt.

Die Masernvirus (MV)-Aufnahme in unreifen humanen DCs (iDCs) erfolgt CD150- und DC-SIGN-abhängig. Allerdings ist die Infektion von DCs restringiert, da diese unfähig zur Produktion viraler Partikel sind. Der Vorgang der Replikation sowie der Zusammenbau von Partikeln sind entscheidende Stufen des viralen Lebenszyklus. Eine effiziente MV-Transmission an T-Zellen ist eine Voraussetzung für eine erfolgreiche Virusdissemination.

5.1 MV-Infektion von iDCs

MHC II⁺ CD11c⁺ DCs in der Mukosa des Respirationstraktes sind die hauptsächlichen Zielzellen für MV-Infektion [1]. Immunfluoreszenzanalysen an Kryoschnitten zeigen, dass nur wenige CD150⁺ DCs im Respirationstrakt vorkommen, jedoch DC-SIGN⁺-Zellen unterhalb des Epitheliums reichlich vorhanden sind [20]. CD150 ist der Eintrittsrezeptor für MV-Wildtypstämme, der ausschließlich von Zellen des hämatopoetischen Systems exprimiert wird. Das Oberflächenniveau von CD150 auf unreifen DCs und ruhenden T-Zellen ist niedrig, steigt jedoch auf ausgereiften DCs (mDCs) und aktivierten T-Zellen. Experimente in der vorliegenden Arbeit konnten zeigen, dass die MV-Infektion DCs ausreifen lässt. Die Ausreifung war gekennzeichnet durch eine höhere Oberflächenexpression von CD86 und eine reduzierte Endozytose-Aktivität (Abb. 4-4, 4-5). Dieses Ergebnis passt zu Beobachtungen, die infolge der MV-Infektion die Expression weiterer Ausreifungsmarker [95], die Ausbildung eines migratorischen Phänotyps, den Wechsel von Antigenaufnahme zu Antigenpräsentation [21] und die Herunterregulierung von DC-SIGN belegen [26]. Die Oberflächenexpression von CD150 war im Vergleich zu uninfizierten DCs auf MV-DCs 24 h p.I. marginal erhöht, während mDCs mehr CD150 als MV-DCs exprimierten (Abb. 4-4). Da MV jedoch besser in iDCs bei gleichen Infektionsdosen replizierte, scheint eine inverse Korrelation zwischen Virusrep-

Diskussion

likation und CD150 Oberflächen-Expression zu bestehen (Abb. 4-2). Eine Studie zeigte, dass das Oberflächenniveau von CD150 auf iDCs transient reguliert werden kann. Die DC-SIGN-Ligation durch das MV löst eine schnelle Aktivierung der sauren und neutralen Sphingomyelinase (ASM und NSM) aus, die eine effiziente und transiente Rekrutierung von CD150 sowie der ASM aus intrazellulären LAMP1⁺-Kompartimenten an die Plasmamembran innerhalb weniger Minuten induziert. Auf der Zelloberfläche kolokalisiert CD150 mit DC-SIGN und verstärkt so den MV-Eintritt [156].

Die Expression von CD150 auf DC wird durch die Ligation mit TLR2 und/oder TLR4-Agonisten [70], CD40L [72] und durch IL-1 β [71] heraufreguliert. Bislang nicht für DCs verifiziert, aktivieren in Monozyten MV H-Proteine den TLR2, aber nicht den TLR4-Signalweg und induzieren die Oberflächenexpression von CD150 [157, 158]. Die Infektion von iDCs mit MV Vakzinestämmen induziert hohe Mengen von IL-1 β Transkripten [95]. Im Gegensatz zu dem Vakzinestamm induziert der Wildtypstamm ebenfalls die Sekretion von IL-1 β durch die Aktivierung des NLPR3 Inflammasoms in THP-1 Zellen. Jedoch wirkt das MV V-Protein durch eine Bindung an NLPR3 der Sekretion entgegen, was insgesamt zu niedrigen Mengen von sekretierten IL-1 β führt [159]. Ob MV-infizierten DCs fähig sind IL-1 β zu sekretieren, konnte noch nicht geklärt werden. Die Beobachtung, dass die GFP⁻-DCs innerhalb der MV IC323-GFP-infizierten DCs CD150 auf der Oberfläche nicht hochregulierten, widerspricht einer IL-1 β Sekretion (Fig. 4-4). Das Oberflächenniveau von CD150 erwies sich als spezifisch reguliert, da in infizierten Kulturen GFP⁻ und GFP⁺ DCs gleiche CD86-Expressionsprofile aufwiesen. Die Unterschiede hinsichtlich der CD150-Oberflächenexpression deuteten auf eine durch das MV direkt oder indirekt kontakt- oder replikationsinduzierte Erhöhung hin. Die marginale Erhöhung steht im Gegensatz zu der beobachteten Herunterregulation von CD150 auf MV-infizierten B95a-Zellen 24 und 48 h p.I, die durch MV H-Protein-Interaktionen induziert wurde [160]. Die Regulation des CD150-Oberflächenniveaus könnte wie folgt geschehen: nach Ligation DC-SIGNs durch MV wird der intrazelluläre Pool von CD150 transient an die Oberfläche rekrutiert, erhöht das Oberflächenniveau und erleichtert MV den Eintritt in die Zelle. 20 min nach DC-SIGN-Ligation sinkt das Oberflächenniveau wieder ab. Nach 24 h Infektion ist das Oberflächenniveau marginal erhöht unabhängig von infektionsinduzierter Ausreifung oder sekretierten Molekülen. Ob das erhöhte Oberflächenniveau durch eine stabile Rekrutierung des intrazellulären CD150-Pools oder durch Initiation der CD150 Expression erfolgt, muss noch untersucht werden.

Diskussion

Trotz einer höheren CD150-Expression in mDCs war die Frequenz MV IC323-GFP-infizierter iDCs und mDCs vergleichbar. Jedoch replizierte MV deutlich effizienter in iDCs, gekennzeichnet durch eine 6-fach höhere Fluoreszenzintensität des Reporterproteins GFP 24 h nach der Infektion (Abb. 4-3). Diese Beobachtung wurde auch für HIV-1 in DCs gemacht. iDCs und mDCs binden HIV-1. mDCs transferieren gebundenes HIV-1 sehr effizient an T-Zellen (*trans*-Infektion), im Gegensatz dazu werden iDCs effizienter infiziert und transferieren *de novo*-produziertes Virus an T-Zellen (*cis*-Infektion). Es konnte gezeigt werden, dass in mDCs die reverse Transkription blockiert ist, und daraus resultierend wurden nur frühe Transkripte gefunden [115]. Dafür verantwortlich sind u.a. die Wirtsfaktoren APOBEC3G/3F (A3G/3F), zwei DNA-Desaminasen und SAMHD1, eine Desoxyribonukleosidtriphosphat-hydrolase (dNTP-Hydrolase). SAMHD1 ist ein HIV-1 Restriktionsfaktor, der spezifisch für DCs und myeloide Zellen ist [161] und dNTPs auf ein intrazelluläres Niveau reduziert, das unter der benötigten Konzentration für die Synthese der viralen DNA durch die Reverse Transkriptase (RT) ist [162].

A3G hingegen restringiert die HIV-1 Infektion durch zwei Mechanismen. Wird es in das Virion eingebaut, fügt A3G massive Hypermutationen in die neugebildete retrovirale DNA ein. Zum anderen wirkt es als Post-Eintrittsrestriktionsfaktor in ruhenden CD4⁺-T-Zellen während der reversen Transkription [163, 164]. A3G kontrolliert auch in iDCs die HIV-1 Infektion durch Einfügen von Hypermutation in das virale Genom. Zusätzlich führt die DC-Ausreifung zu einem erhöhten Niveau von A3G und erklärt die höhere Restriktion der HIV-1 Infektion [165]. Wie kürzlich gezeigt wurde, ist auch die MV-Infektion A3G sensitiv, da A3G-überexprimierende Zellen eine Reduktion der Infektiosität um 1-2 log-Stufen aufwiesen, die mit einer Reduktion der viralen Transkription und Proteinexpression um 50-70 % einherging [166]. MV-DCs produzierten mindestens eine log-Stufe weniger Virus und zeigten eine verminderte Akkumulation viraler Proteine als B95a-Zellen (Abb. 4-6, 4-7). Diese sind Epstein-Barr Virus (EBV)-transformierte B-Lymphblastoide Zellen aus dem Krallenaffen, die im Gegensatz zu humanen B-Zellen zwar A3G exprimieren, das SIV, möglicherweise jedoch nicht MV, hemmen kann, [167]. Ob humanes A3G in DCs zur MV-Restriktion beiträgt, müsste in Folgeexperimenten untersucht werden.

Die verminderte Akkumulation viraler Proteine trug zu einer Reduktion der produzierten Viruslast in DCs im Vergleich zu B95a-Zellen bei. Eine Restriktion der Virusproduktion in DCs wurde auch für das Herpes-Simplex-Virus beschrieben [168]. In dieser Arbeit sollte im Folgenden die subzelluläre Verteilung der viralen Proteine und im Besonderen des M-Proteins in

Diskussion

MV-DCs untersucht werden, um zu überprüfen, ob eine veränderte Sortierung der Proteine oder Kompartimentierung zusätzlich zur Reduktion der Virusmorphogenese und Freisetzung beitragen könnte. Zuerst wurde überprüft, ob das M-Protein an DRMs / Lipid Rafts assoziiert ist. Sowohl durch Dichtegradienten-Zentrifugation als auch durch Immunfluoreszenzfärbung konnte eine Fraktion DRM-assoziiertes M-Protein detektiert werden. Die Assoziation des M-Proteins mit Lipid Rafts ist von großer Bedeutung, weil sie sowohl für HIV-1 als auch für MV den Ort der Partikelmorphogenese darstellen [66, 132].

In den folgenden Immunfluoreszenzfärbungen wurde die Kolokalisation der viralen Proteine untereinander nach 24 h Infektion untersucht. Die Titration zeigte, dass nach 24 h Partikel gebildet und freigesetzt wurden, weil diese zellassoziiert und im Überstand detektiert werden konnten (Abb. 4-6). In MV-DCs wurden starke Assoziationen des M-Proteins mit Komponenten des RNP-Komplexes, N- und P-Proteine, und Kolokalisationen der N- und P-Proteine selbst gefunden ($R_r > 0.7$). Es konnte bereits gezeigt werden, dass die Expression von M-Proteinen essentiell für den RNP-Transport aus intrazellulären Inklusionen zur Plasmamembran ist [37]. Zusätzlich bindet das M-Protein an den RNP-Komplex, um die virale Transkription zu regulieren bzw. zu inhibieren [58]. Die starke Assoziation des M-Proteins in MV-DCs mit Proteinen des RNPs könnte zum einen darauf hindeuten, dass das M-Protein in einem größeren Umfang die Transkription inhibiert als in B95a-Zellen, wo M-Protein nur partiell mit N-Protein, jedoch stark mit P-Protein kolokalisierte. Zusätzlich ist die Assoziation von M- und H-Proteinen sehr deutlich in B95a-Zellen, währenddessen in MV-DCs nur eine partielle Kolokalisation aufgezeigt werden konnte. F- und H-Proteine liegen auf der Zelloberfläche in einem Komplex vor. Die zytoplasmatischen Enden des F- und H-Proteins interagieren physisch und funktionell mit dem hydrophoben M-Protein [35, 36]. In Fibroblasten, die transient MV M- und F-Protein exprimieren, wurde gezeigt, dass die Assoziation des M-Proteins durch die Expression des F-Proteins verstärkt wird und beide Proteine die Produktion virusähnlicher Partikel (VLPs) fördern [59, 169]. Möglicherweise führt die stärkere Interaktion von M- und H-Proteinen in B95a-Zellen zu einer effizienteren Partikelproduktion.

Die Analyse der Kolokalisation des M-Proteins mit Markern des sekretorischen Transportweges zeigte kaum Unterschiede zwischen MV semi-permissiven MV-DCs und permissiven B95a-Zellen. Das M-Protein wies eine partielle Assoziation mit Markern des ERGIC und COP I-Kompartimenten auf, jedoch keine mit dem cis-Golgi bzw. TGN. Die Ergebnisse der Kolokalisationsanalyse mit Markern des sekretorischen Transportweges sind überraschend, denn bisher konnte nur gezeigt werden, dass die viralen Glykoproteine mit sekretorischen

Diskussion

Kompartimenten assoziiert sind. Im ER interagieren die Glykoproteine mit zellulären Chaperonen des ER, z.B. Calnexin. Die MV-Infektion erhöht zusätzlich die Expression der Chaperone [170]. Des Weiteren heterooligomerisieren die Glykoproteine im ER und werden entlang des sekretorischen Transportweges über den Golgi-Apparat zur Plasmamembran transportiert [65, 171]. Jedoch ist auszuschließen, dass das M-Protein mit den Glykoproteinen kotransportiert wird [63].

Die Kolokalisationsanalysen viraler Proteine mit Markern des endosomalen Transportweges ergaben kaum Assoziationen. Das M-Protein kolokalisierte partiell mit Markern der *recycling* Endosomen, mit AP-3 und pMHC II-Kompartimenten in MV-DCs. Die Funktion von *recycling* Endosomen während der MV-Infektion ist unklar. AP-3 ist wichtig für den Vesikeltransport zu späten Endosomen, MVBs und Lysosomen. In HIV-1 infizierten Zellen konnte eine direkte Interaktion des Gag-Proteins mit der δ -Untereinheit des AP-3 Komplexes gezeigt werden, die wichtig für den Transport des Gag-Proteins zur Plasmamembran und somit für den Freisetzungsprozess ist [172]. Wird die δ -Untereinheit des AP-3 Komplexes mittels siRNA ablatiert, ist die Partikelfreisetzung signifikant reduziert [119]. Ob das M-Protein direkt mit dem AP-3 Komplex interagiert oder indirekt mit anderen viralen oder zellulären Proteinen, muss in weiterführenden Experimenten untersucht werden. Im Gegensatz zu MV-DCs konnte in infizierten B95a-Zellen eine partielle Kolokalisation mit dem Marker früher Endosomen gezeigt werden. Für das HIV-Gag-Protein wurde ebenfalls eine Assoziation mit den frühen Endosomen detektiert, jedoch bleibt deren funktionelle Bedeutung unbekannt [173]. Die DC-spezifischen transienten Proteinaggregate, die während der LPS-induzierten Ausreifung entstehen (*DC aggresome-like inducible structures*, DALIS), wurden auch in MV-infizierten DCs gebildet. In Influenzavirus-infizierten DCs lagen die viralen Proteine mit DALIS assoziiert vor [135]. Jedoch konnte in den MV-infizierten DCs keine Kolokalisation von M-Proteinen mit den DALIS nachgewiesen werden, die Assoziation von DALIS mit dem Glykoprotein H und dem Nukleocapsidprotein wurden jedoch in dieser Arbeit nicht untersucht. In HIV-infizierten Makrophagen konnte das virale Partikel in MHC II Kompartimenten gefunden werden [174]. MV M-Protein kolokalisierte partiell mit pMHC II (CDw78) in iDCs, jedoch nicht in B95a-Zellen. Der verwendete Antikörper detektiert membranständiges Tetraspanin-assoziiertes MHC II [136, 175], das mit einem Peptid beladen ist. MHC II ist nachweislich mit den Tetraspaninen CD53, CD81 und CD82 assoziiert [176].

Um zu untersuchen, ob MV-Proteine ebenfalls mit Tetraspaninen kolokalisieren, wurde die subzelluläre Verteilung viraler Proteinen in Tetraspanin-positiven Kompartimenten analysiert.

Diskussion

Tetraspanine sind Transmembranproteine, die zwei extrazelluläre Schleifen und namensgebend vier Transmembranregionen besitzen. Sie zeichnen sich durch ihre Fähigkeit aus, molekulare Interaktionen untereinander und mit anderen Oberflächenproteinen, wie z.B. Integrinen, einzugehen und zu strukturellen Plattformen zu assoziieren. Diese Plattformen, die auch als tetraspaninreiche Mikrodomänen (TEMs) bezeichnet werden [177], haben ähnliche Funktionen wie DRM-Mikrodomänen. Die Assoziation von MV-Proteinen mit verschiedenen Tetraspaninen wurde untersucht, da deren Bedeutung für die Freisetzung von HIV und Influenzaviren belegt ist [139, 178] und HIV Gag-Protein die Vereinigung von TEMs und Lipid Rafts am Ort der Partikelmorphogenese in der Plasmamembran induziert [179]. Die Kolokalisationsanalyse zeigte in iDCs keine eindeutigen Assoziationen von MV-Proteinen mit Tetraspaninen. Der Pearson Koeffizient (R_r) lag bei allen Färbungen zwischen 0.39 und 0.59 und damit sehr nah beieinander. Die Ergebnisse sind zudem nicht eindeutig, da Tetraspanine nicht nur Homodimere, sondern auch Heterodimere bilden können, z.B. CD9, CD81 und CD151 [180]. Der Vergleich der IF-Färbungen für die Tetraspanine zwischen iDCs und B95a-Zellen zeigte eine deutlich veränderte Verteilung von CD81 in B95a-Zellen, wo das Molekül eindeutig intrazellulär mit MV P-Protein kolokalisierte ($R_r > 0.8$). In iDCs war CD81 vornehmlich mit der Plasmamembran assoziiert und nicht mit dem P-Protein. Das Tetraspanin CD63 (LAMP-3) ist hauptsächlich Bestandteil der inneren Membranen später Endosomen der MVBs, eher intrazellulär lokalisiert und kolokalisiert nachweislich mit den lysosomalen Glykoproteinen LAMP-1 und LAMP-2 [181]. In B95a-Zellen akkumulierte CD63 mit dem P-Protein in großen Aggregaten, in iDCs kolokalisieren beide Proteine jedoch nur partiell. In HIV-1 infizierten Makrophagen findet die HIV-Partikelmorphogenese an einem intrazellulären Kompartiment statt, in dem CD81, CD9, CD53 aggregieren und in das CD63 infolge der Infektion rekrutiert und effizient in die Viruspartikel eingebaut wird [140, 182]. Dieses für HIV beschriebene intrazelluläre *assembly*-Kompartiment konnte für MV weder in iDCs noch in B95a-Zellen gefunden werden. In B95a-Zellen könnte es ein Replikationskompartiment geben, das durch Cluster aus CD63, CD81 und P-Protein beschrieben werden kann. Um zu überprüfen, ob auch das N-Protein als wichtigste Komponente des RNP-Komplexes ebenfalls mit CD63 und CD81 kodetektierbar ist, müssten zusätzliche Kolokalisationsanalysen durchgeführt werden. Nachdem bereits gezeigt werden konnte, dass N- und P-Protein in B95a-Zellen partiell kolokalisieren (Abb. 4.9), ist von einer CD63- und CD81-Aggregation mit MV N- und P-Protein auszugehen. Ob dies Orte der viralen Replikation sind, muss experimentell untersucht werden. Für iDCs konnten diese Kolokalisationen nicht beschrieben werden. Mög-

Diskussion

licherweise ist die Translation der primären Transkripte in DCs beeinträchtigt. Daraus folgt eine reduzierte Proteinakkumulation, eine verminderte Bildung von Replikationsorten, die schließlich zu einer relativen Unfähigkeit der Partikelbildung und –Freisetzung führen könnte. Im Gegensatz zu den MV-DCs zeigten die Färbungen in MV-B95a eine stärkere Differenzierung der Tetraspanine in ihrer Assoziation mit viralen Proteinen und eine Inhibition der räumlichen Interaktion untersuchter Tetraspanine. Wahrscheinlich beeinflusst die MV-Infektion in B95a-Zellen die Lokalisation und die Expression der Tetraspanine. Die Assoziation der viralen Proteine mit einem Tetraspanin gibt allein noch keine Auskunft über die Notwendigkeit der Assoziation für die Partikelbildung, wie für die CD63 Expression in HIV-infizierten Makrophagen gezeigt werden konnte. Die Ablation der CD63 Expression hatte keinen Einfluss auf die HIV-Produktion [183]. Durch die funktionelle Redundanz der Tetraspanine ist es schwierig, die Bedeutung einzelner Tetraspanine für die MV-Infektion und Partikelmorphogenese zu untersuchen [177].

Die Analyse der subzellulären Verteilung der viralen Proteine ergab keine Hinweise auf ein MV „*virus-containing compartment*“ (VCC) in DCs, wie es für HIV in DC beschrieben wurde [119]. Das intrazelluläre HIV-VCC in iDCs wurde beschrieben durch das Vorkommen der Tetraspanine CD81, CD82 und CD9 und der δ -Untereinheit des Adaptorproteins 3 (AP-3) sowie einer Verbindung zur Plasmamembran. Zwar konnten partielle Kolokalisationen des M-Proteins mit AP-3 und CD81 detektiert werden, jedoch akkumulierten nicht alle viralen Proteine in einem Kompartiment, sondern erscheinen eher intrazellulär verteilt.

In Übereinstimmung mit HIV kolokalisierten MV H-Proteine und M-Proteine mit dem membranimpermeablen HRP, das zum Visualisieren von Membraneinstülpungen bzw. Kompartimenten, die mit der Plasmamembran verbunden sind, verwendet wird (Abb. 4-21). Diese Membraneinstülpungen könnten entweder Orte der Partikelbildung und/oder der Virus-Freisetzung sein oder Lagerorte für entweder *getrapptes* oder *de novo* synthetisiertes MV. Für Makrophagen wurden CD81⁺-Plasmamembran-abgeleitete Invaginationen gefunden, in denen HIV konzentriert vorkam [140, 184]. Für MV-DCs konnten mit den gewählten Markern keine Veränderungen der Lokalisation intrazellulärer Strukturen beobachtet werden.

Eine frühere Publikation stellte fest, dass die zelluläre GTPase Rab9, die den Vesikeltransport von späten Endosomen zu *trans*-Golgi-Netzwerk reguliert, für die Replikation von HIV, Ebolavirus und MV wichtig ist [185]. Es wurde jedoch weder eine Kolokalisationen von M-Proteinen mit dem *trans*-Golgi-Netzwerk noch mit dem späten Endosomen festgestellt, sodass der M-Proteintransport wahrscheinlich Rab9 GTPase-unabhängig ist. Entweder steuert die

Diskussion

GTPase den Transport der Glykoproteine oder des RNP-Komplexes oder der Einfluss ist indirekter Art. Rab7, Rab9 und Rab 11 regulieren den normalen Sphingolipid- und Cholesterol-Transport in Zellen [186]. Eine interessante Möglichkeit wäre, dass die Inhibition der Rab9-Expression den Cholesterol- und Sphingolipid-Transport dysreguliert mit der Konsequenz, dass die Partikelbildung in Lipid Rafts inhibiert ist [185].

Eine wichtige Rolle für die MV Replikation spielen außerdem Komponenten des Zytoskeletts. Die intrazelluläre Lokalisierung viraler Proteine, die mithilfe des polyklonalen anti-MV-Serums detektiert wurden, war zwar signifikant nicht durch die Behandlung von Inhibitoren des Aktinzytoskeletts oder der Mikrotubuli verändert, jedoch war die Virusproduktion inhibiert [187]. Weitere Experimente könnten durchgeführt werden, die die subzelluläre Verteilung einzelner virale Proteine nach der Behandlung mit Zytoskelett-Inhibitoren überprüfen.

Die Nachteile der gewählten Kolokalisationsanalyse waren, dass die subzelluläre Verteilung der viralen Proteine nur zeitlich punktuell und nicht dynamisch analysiert wurde. Es ist nicht auszuschließen, dass Infektionsstadien-spezifische Veränderungen der Akkumulation viraler Proteine auftreten oder dass deren Assoziation mit zellulären Kompartimenten transient ist. Zusätzlich kann eine Kolokalisation keine Aussage über eine funktionelle Assoziation zweier Proteine machen. Um die subzelluläre Verteilung *de novo*-synthetisierter M-Proteine untersuchen zu können, wurde ein Methode benötigt, die die Detektion des M-Proteins in lebenden DCs ermöglicht.

5.2 Die Detektion von MV M-TC-Fusionsproteinen

Um das M-Protein in lebenden Zellen zu detektieren und so den Transportweg *de novo*-synthetisierter M-Proteine von der Synthese bis zur Partikelmorphogenese untersuchen zu können, wurde ein Tetracystein (TC)-Tag eingefügt, dessen minimale Größe 6 Aminosäuren der Sequenz CCPGCC sind. Der biarsenische Farbstoff FIAsh ist membranpermeabel, bindet an die vier Cysteine und emittiert Fluoreszenz nach einer Anregung mit UV-Licht. Die Funktionalität des TC-Tags in lebenden Zellen konnte bereits in Transfektions- und Infektionsexperimenten mit HIV-Fusionsproteinen gezeigt werden. Das TC-getaggte Gag-Fusionsprotein akkumulierte in spezifischen Plasmamembran-Domänen kurz nach der Translation [188] und definierte einen intrazellulären Transportweg, der perinukleäre Kompartimente und MVBs als

Diskussion

Transport-Zwischenstationen einschloss, an denen auch der Zusammenbau von Intermediaten und VLPs erfolgte [189]. Die Infektion von DCs mit einem rekombinanten replikationskompetenten HIV-1, das das TC-Motiv im C-Terminus des p17 Matrixproteins innerhalb des Gag-Polyproteins trägt, zeigte verschiedene Stadien des Virus-Lebenszyklus und den Transfer zu Nachbarzellen [129]. In infizierten Makrophagen wurde eine Population des Gag-Proteins charakterisiert, die sich in internen Kompartimenten anreichert und nach Zugabe von T-Zellen an die Kontaktstelle innerhalb der VS polarisiert [190].

Um die Anwendbarkeit des TC-Tags in MV-Infektionssystemen zu untersuchen, wurde der TC-Tag zuerst an den C-Terminus des M-Proteins fusioniert. Die transiente Expression des M-TC-Fusionproteins wurde in HeLa-Zellen (Abb. 4-14) mittels Antikörper-, FAsH- und ReAsH-Färbung sowohl im Fluoreszenzmikroskop als auch im Durchflusszytometer und in primären transfizierten DCs (Abb. 4-16) nachgewiesen. Das MV M-Protein ist mit speziellen Membranmikrodomänen, den DRMs, assoziiert [64] und oligomerisiert in höhermolekulare Komplexe, die als VLPs ins Medium freigesetzt werden [59]. In transfizierten HeLa-Zellen, die M-TC-Proteine transient exprimierten, konnte sowohl die Assoziation des Fusionsproteins mit DRMs als auch die Freisetzung von VLPs bestätigt werden (Abb. 4-15) und damit essentielle Eigenschaften des M-Proteins für die Partikelbildung. Im Vordergrund der Analysen stand jedoch die Expression des M-Proteins während einer MV-Infektion. Deshalb wurde ein rekombinantes MV generiert, das das M-TC-Fusionsprotein exprimiert. Das rekombinante rMV323 M-TC (MV-Wildtypstamm: IC323) infizierte DCs und das M-TC-Protein konnte erfolgreich mittels Fluoreszenzmikroskop in DCs detektiert werden. Die subzelluläre Verteilung des rekombinanten M-TC-Proteins in DCs war deutlich geclustert und vergleichbar mit der Expression des unmodifizierten M-Proteins vornehmlich an der Plasmamembran detektierbar, aber auch intrazellulär verteilt (Abb. 4-18). Allerdings war die Frequenz infizierter FAsH⁺ DCs gering, was wahrscheinlich auf die niedrigen Titer der Rekombinante (nie höher als 4×10^4 PFU / ml), aber auch auf das schnelle Ausbleichen des Fluoreszenz nach Anregung zurückzuführen war. Das rekombinante Virus zeigte ein auffälliges Wachstum, indem es sich innerhalb von 2 Tagen in der Vero SLAM-Zellkultur ausbreitete, danach jedoch keine weitere Ausdehnung der Plaques beobachtet wurde, die sich relativ schnell ablösten (Abb. 4-17). Um die Viruszucht zu verbessern, wurden vor der Infektion Vero SLAM-Zellen mit WTF M-Protein-kodierenden Plasmiden transfiziert, die Expression nach 24 h im Durchflusszytometer bestätigt und anschließend mit rMV323 M-TC infiziert. Jedoch konnte weder eine Steigerung der Titer noch eine effizientere Ausbreitung der Plaques beobachtet werden. Die Analyse der

Replikation des rMV323 M-TC sowie die Akkumulation viraler Proteine im Vergleich zu dem Wildtypstamm MV-IC323 könnte Aufschluss über eine Beeinträchtigung bringen, die durch die Expression des Fusionsproteins induziert wird. Zusammenfassend ist festzustellen, dass der TC-Tag im Viruskontext nicht gut toleriert wurde, was zu niedrigen Titern führte. In einer kürzlich erschienenen Publikation ist die Fusion des TC-Tags an alle Strukturproteine, Enzyme und das Glykoprotein gp120 innerhalb eines kompletten HIV-1-Genoms beschrieben. Es zeigte sich, dass die Infektiosität des rekombinanten Virus von der Position der Insertion des TC-Tags abhing [191]. Zusätzlich wurde die Detektion von FAsH-gefärbtem M-TC-Protein durch das relativ schnelle Ausbleichen der grünen Fluoreszenz erschwert. Das schnelle Ausbleichen und die geringe Anzahl FAsH⁺ DCs erschwerten die dynamische Analyse des intrazellulären Transportes des M-Proteins.

5.3 MV-Transmission von DCs an autologe T-Zellen innerhalb der Virologischen Synapse

Weil die Virusproduktion und Freisetzung ineffizient in DCs erfolgt, könnte die zellassoziierte MV-Transmission an T-Zellen die Schlüsselposition für die Virusdissemination sein. Als Hinweis auf eine MV-Transmission konnten bereits MV-DCs in Verbindung mit infizierten T-Zellen in lymphoiden Geweben 9 Tage nach Infektion in einem Tiermodell für die MV-Infektion detektiert werden [1]. Für HIV wurde gezeigt, dass die Virus-Transmission von DCs an T-Zellen, aber auch von T-Zelle an T-Zelle, innerhalb der virusinduzierten VS der effektivste Übertragungsweg ist [192]. Um die Effizienz der MV-Transmission, die Bildung der VS sowie essentielle Komponenten, die für die Transmission entscheidend sind, zu analysieren, wurde ein autologes Zellsystem verwendet.

Die Infektion von T-Zellen kann über verschiedene Wege erfolgen, entweder durch zellfreies oder durch zellassoziiertes Virus. Die zellfreie Infektion von T-Zellen ist eher in *in vitro* Zellsystemen von Bedeutung. Transmissionsexperimente mit HIV zeigten, dass DCs für eine effiziente Transmission nicht infiziert sein müssen (*cis*-HIV-DCs), sondern dass bereits die Beladung und Internalisierung von HIV ausreichend ist (*trans*-HIV-DCs). Als Voraussetzung für die *trans*-Infektion konnte gezeigt werden, dass DCs mit UV-MV ebenfalls beladen werden können und dass Proteine des gebundenen Virus nach 24 und 48 h an der Plasmamembran

Diskussion

detektierbar waren (Abb. 4-20). Im nächsten Schritt wurde die Effizienz der zellfreien Infektion von T-Zellen mit der Virusübertragung von *cis*- oder *trans*-MV-DCs durch die Bestimmung der Frequenz infizierter T-Zellen verglichen. Es konnte dargestellt werden, dass die MV-Transmission von *cis*-MV-DCs am effektivsten war (Abb. 4-22). Wahrscheinlich dienen *cis*-MV-DCs auch *in vivo* als Transmissionsvektoren. Die HIV-Transmission verläuft biphasisch – innerhalb der ersten zwei Tage werden T-Zellen durch *trans*-HIV-DCs infiziert, bis die Replikation von HIV zur Produktion von viralen Partikeln führt und *cis*-HIV-DCs T-Zellen infizieren [116]. Die *cis*-Infektion ermöglicht damit längerfristig die Infektion von T-Zellen [193]. Diese Unterteilung des Virustransfers in zwei Phasen könnte auch für MV zutreffen. Prinzipiell kann die *trans*-Infektion nur so lange erfolgen, wie MV auf der Oberfläche von DCs gebunden ist.

Es konnte gezeigt werden, dass die MV-*cis*-Infektion von T-Zellen zeitabhängig war. Die Dauer von 15 min Transmission waren ausreichend, um die Hälfte aller T-Zellen, die nach einer Infektionsdauer von 2 h infiziert sind, zu infizieren (Abb. 4-23). Dies korreliert mit Befunden aus dem HIV-System, in dem eine Mindestdauer von 10 min für die Bildung einer VS detektiert wurde [110].

CD150 ist der MV-Eintrittsrezeptor, der auf stimulierten P/I- und α CD3/28-T-Zellen heraufreguliert wurde (Abb. 4-19). Um die Bedeutung von CD150 für die Transmission zu untersuchen, wurden CD150 auf den T-Zellen durch spezifische Antikörper blockiert. Die Blockade von CD150 reduzierte die Frequenz infizierter T-Zellen um 50 % (Abb. 4-24A). Die Analyse der Frequenz infizierter T-Zellen unterstrich die Bedeutung von CD150 für die Transmission, da stimulierte T-Zellen häufiger infiziert waren als unstimulierte T-Zellen (Frequenz CD3⁺/GFP⁺ im Durchschnitt: 10 % unstimuliert, jedoch 52% P/I und 36 % α CD3/28). Zusätzlich war die MFI und damit einhergehend die Akkumulation des Reporterproteins GFP in den stimulierten T-Zellen höher als in unstimulierten Zellen. Diese Beobachtung ist im Einklang mit einer älteren Publikation, die zeigte, dass MV in Mitogen-stimulierten T-Zellen besser replizierte [194]. Die homotypische Interaktion von CD150 hatte keinen zusätzlich stabilisierenden Effekt auf die Konjugatbildung, da die Vorbehandlung von DCs mit CD150-spezifischen Antikörpern die Transmission nicht beeinflusste (Abb. 4-24B). Die heterotypische Interaktion von CD150 mit MV H-Glykoproteinen ist hochaffin [33] und seine Zugänglichkeit für CD150 auf der Zelloberfläche ist bedeutend für die Effizienz der MV-Transmission (Abb. 4-25). Die additive Blockierung mit zwei neutralisierenden Antikörpern, die unterschiedliche Epitope im Glykoprotein H erkennen [143], zeigte, dass für eine erfolg-

Diskussion

reiche Transmission verschiedene Epitope des H-Proteins von Bedeutung sind. Diese Beobachtung ist im Einklang mit den beschriebenen Bindungsstellen in der Kristallstruktur, die für das MV-H-Protein im Komplex mit CD150 gemacht wurden. Die Kristallstruktur zeigte, dass das H-Protein vier Bindungsstellen für CD150 aufweist. Die Mutationen der einzelnen MV-H-Aminosäuren Ile194, Asp505, Asp507, Asp530, Arg 533, Phe552 und Pro554, die in den vier Bindungsstellen liegen, interferierte jeweils mit der Bindung an CD150 und damit mit der MV-Infektion [33]. Die Präinkubation von zwei H-spezifischen Antikörpern führte wahrscheinlich zu einer Blockierung wichtiger Bindestellen oder zu einer sterischen Hinderung der CD150 / H-Protein-Interaktion. Die Transmission konnten mit der Vorinkubation von CD150- und H-spezifischen Antikörpern jeweils um etwa 50 % inhibiert werden. Um die Transmissionsereignisse stärker zu reduzieren, könnten zusätzlich in einem Ansatz DCs und T-Zellen parallel mit Antikörpern präinkubiert und die Frequenz infizierter T-Zellen im Durchflusszytometer gemessen werden. Anstatt einer Vorinkubation von Zellen mit blockierenden Antikörpern könnten die Antikörper während des Transmissionsprozesses zugegeben werden, um die Zugänglichkeit von Antikörpern in die VS während der Konjugatbildung zu untersuchen.

Möglicherweise konnte die Transmission nicht stärker blockiert werden, weil Ko-Rezeptoren wie z.B. Moesin [154, 155] oder Substanz P Rezeptor (SPR) [151] die Virusaufnahme unterstützen. In Neuronen wurde zudem gezeigt, dass Transmissionsereignisse des MV-Vakzinestammes in Abwesenheit einer CD46-Expression auftraten. Vermutlich ist hierfür die Interaktion des F-Proteins mit SPR ausreichend [151], die effizient durch FIP-Zugabe, aber nicht durch CD150- oder H-Protein-spezifische Antikörper blockiert wird. Zusätzlich könnte CD150 in T-Zellen kompartimentiert sein, z.B. in Membraneinstülpungen, die eine vollständige Absättigung von CD150 auf T-Zellen mit spezifischen Antikörpern erschwert. Die viralen Glykoproteine weisen komplexe Glykosylierungen auf, die einen Einfluss auf die Proteinfaltung und -konformation, auf die Interaktion mit Rezeptoren und auf die Detektierbarkeit durch das angeborene Immunsystem und Antikörpern haben können [195, 196]. Beispielsweise weist HIV gp120 zelltypspezifische Glykosylierungen auf. Die veränderten Glykosylierungsmuster haben einen Einfluss auf die antigenen Eigenschaften des Glykoproteins gp120, die bewirken, dass 8- bis 10-mal mehr neutralisierende Antikörper eingesetzt werden mussten, um produziertes HIV von Makrophagen zu blockieren im Vergleich zu Virus, das von PBMCs produziert wurde [197]. Veränderte Glykolysierungen des MV H-Protein könnten die Effektivität neutralisierender Antikörper beeinflussen.

Diskussion

Die vorangegangenen Experimente dienten der Analyse der Frequenz und Effizienz der MV-Transmission in autologen Zellkulturen. Um die Existenz und die Architektur einer MV-induzierten VS eingehender zu untersuchen, wurden fluoreszenzmikroskopische Analysen der Zellkonjugate durchgeführt. Zunächst konnte gezeigt werden, dass präaktivierte T-Zellen häufiger Polykonjugate bilden und damit die Anzahl der Kontaktflächen für den Virustransfer erhöhen (Abb. 4-26). Eine simultane Zell-Zell-Transmission von HIV zu multiplen Zielzellen durch Polysynapsen konnte ebenfalls nachgewiesen werden. Es wird vermutet, dass die Polysynapsen eine exponentielle Virusdissemination sowie die Abschirmung vor dem Immunsystem fördern [112].

Experimente mit HIV-infizierten Zellen zeigen, dass das Aktinzytoskelett eine wichtige Rolle während der Virustransmission spielt [103, 144]. Im Besonderen ist die induzierte Aktindynamik wesentlich, weil deren Prävention in HIV-DCs sowohl die Ausbildung einer VS als auch den Virustransfer inhibiert [124]. Die Analyse der subzellulären F-Aktin-Verteilung zeigte eine Akkumulation an der Kontaktstelle zusammen mit dem MV-Glykoprotein H. Diese Akkumulation von F-Aktin unterschied sich zwar statistisch nicht signifikant von Konjugaten, die zwischen Mock-DCs und T-Zellen gebildet wurden, jedoch war eine Tendenz klar erkennbar (Abb. 4-27A). In selteneren Fällen konnte die Ausbildung von Filopodien zwischen MV-DC und T-Zelle beobachtet werden, mit denen MV H-Protein assoziiert war (Abb. 4-27B). Interzelluläre Verbindungen konnten bereits zwischen MV-DC / T-Zell-Clustern [20] und HIV-induzierten Nanotubes in Makrophagen detektiert werden [198]. Die Virus-Transmission über die Ausbildung von aktinreichen Ausstülpungen ist wahrscheinlich eher von Bedeutung, wenn die Anzahl der T-Zellen die Anzahl an DCs weit übersteigt und wenn gebundenes Virus an T-Zellen übertragen wird (*trans*-Infektion) [124]. Eine kürzlich erschienene Publikation konnte zeigen, dass infizierte DCs HIV über virale Filopodien (VF) verbreiten, die abhängig von der Expression des Formins Diaph2 gebildet werden. Formine sind in Prozessen der Aktin-Polymerisierung involviert und assoziieren mit den schnell wachsenden Enden von Aktinfilamenten [199]. Der Ausbildung von DC / CD4 T-Zell-Kontakten gehen VF-Kontakte voraus [200]. Aufgrund der geringen Frequenz von beobachteten MV-assoziierten Filopodien ist es wahrscheinlich, dass dieser Weg der Virusübertragung in Kultur selten und im Vergleich zum Transfer innerhalb einer VS an den Kontaktflächen ineffizient ist. Es kann jedoch nicht ausgeschlossen werden, dass durch die Wahl eines anderen Substrats, auf dem die Zellen adhären, die Frequenz der Filopodien erhöht werden kann. Bei-

Diskussion

spielsweise konnte gezeigt werden, dass Membrannanotubes präferenziell eher auf Fibronektin (FN)- als auf PLL-beschichteten Objektträgern ausgebildet werden [201].

Die Ausbildung einer VS innerhalb von Zellkonjugaten wird durch die Akkumulation viraler Proteine und des Eintrittsrezeptors beschrieben. Die Analyse der zellulären Verteilung von MV-Glykoprotein H zeigte eine deutliche Akkumulation an der Kontaktfläche von MV-DC und T-Zelle (Abb. 4-28A). Um die Bedeutung der VS als Orte der Transmission entweder für virale Partikel oder für RNP-Komplexe zu unterstreichen, wurde zusätzlich das MV Phosphoprotein P als Marker für den RNP-Komplex gefärbt. Auch das P-Protein akkumulierte an der Kontaktfläche (Abb. 4-28B). Die Lokalisation von Glykoproteinen und RNP-Komplexen deutet darauf hin, dass entweder virale Partikel oder RNP-Komplexe zusammen mit MV-Glykoproteinen an der Kontaktstelle präsent sind. Die Kontaktstelle könnte als Ort der Partikelproduktion fungieren oder bereits zusammengebaute Partikel werden an diese Kontaktstelle transportiert. Möglicherweise werden anstatt von Viruspartikeln RNP-Komplexe durch Mikrofusionen der Zellmembranen transmittiert. In Neuronen konnte gezeigt werden, dass der transsynaptische MV-Transfer durch den RNP-Komplex sowie dem F-Protein ermöglicht wird. Das F-Protein interagiert wahrscheinlich mit dem Substanz P Rezeptor (SPR) und induziert die Entstehung von Mikrofusionen, die dem RNP-Komplex erlauben, die Synapse zu überqueren und das über die Synapse verbundene Neuron zu infizieren [202, 203]. Zusätzlich wurde auch ein effizienter Transfer von persistierenden MV-infizierten Zellen zu HeLa-Zellen beschrieben, der ebenfalls abhängig von viralen Glykoproteinen und RNP-Komplexen war und zu einer Infektion der HeLa-Zelle führte. Es wurde postuliert, dass der Virustransfer durch Mikrofusionen an der Kontaktstelle bewerkstelligt wurde [204]. Daher kann nicht ausgeschlossen werden, dass anstatt viraler Partikel RNP-Komplexe transmittiert werden.

In Übereinstimmung mit den Beobachtungen, die für die HIV-induzierte VS gemacht wurden, konnte ebenfalls für MV-VS eine Relokalisierung des Eintrittsrezeptor CD150 zur Kontaktfläche detektiert werden. Die Abb. 4-28A und Abb. 4-29A unterstreichen die Bedeutung MV-induzierter Polysynapsen als Orte der MV-Transmission, da sowohl MV-H-Proteine als auch CD150 an den Kontaktstellen der Polykonjugate akkumulieren. Um die MV-induzierte Akkumulation von CD150 detaillierter zu untersuchen, wurden T-Zellen transient mit HA-getagtem CD150 transfiziert. Der Fokus wurde auf die Lokalisierung von CD150 in T-Zellen gelegt, weil zum einen präaktivierte T-Zellen ein hohes CD150-Oberflächenexpressionsniveau (Abb. 4-19) im Gegensatz zu MV-DCs aufwiesen und zum anderen die Verfügbarkeit von CD150 auf DCs keinen Einfluss auf die Transmission hatte

Diskussion

(Abb. 4-24), obwohl in infizierten DCs CD150 mit MV H- und M-Proteine kolokalisierten (Abb. 4.9 rechte Spalte). CD150-HA aggregierte deutlich MV-abhängig an der Kontaktfläche der Zellkonjugate (Abb. 4-29B). Das CD150-Protein könnte mit Mikrodomänen assoziiert sein, z.B. Lipid Rafts, die eine räumliche Akkumulation von CD150 und einen verbesserten MV-Eintritt bewirken. Das einzige bekannte Mitglied der SLAM-Familie, das in Lipid Raft-Mikrodomänen vorkommt, ist SLAMF4 (2B4) [205, 206].

Das Clustern von CD4 und Integrinen in der HIV-induzierten VS ist abhängig von der Dynamik des Aktinzytoskeletts und vermittelt die Polarisierung von der HIV-Proteine Env und Gag zur VS [103]. Ein dynamisches Zytoskelett ist wichtig für die Partikelbildung und Freisetzung [187]. Es wird vermutet, dass CD150 die Dynamik des Aktinzytoskeletts regulieren kann, weil spezifische Adapter (SLAM-assoziierte Protein, SAP) in T-Zellen CD150 an einen nachgeschalteten Signalweg koppeln, der die Rekrutierung des p21 *activated kinase* (PAK) *interacting exchange*-Faktors (PIX) induziert [207]. PAK verbindet die Rho GTPasen mit dem Zytoskelett und reguliert so die Reorganisation des Zytoskeletts. Die Vorbehandlung CD150-HA transient exprimierender T-Zellen mit LatB beeinträchtigte deutlich die CD150-HA Rekrutierung zur VS (Abb. 4-30). Der Einfluss von Aktin auf die Umverteilung viraler Proteine zur VS kann jedoch nicht untersucht werden, da die Vorbehandlung von DCs mit Inhibitoren des Aktinzytoskeletts, wie z.B. Latrunculin B, die Substratadhäsion und Konjugatbildung beeinträchtigt. Die Bedeutung von Aktinfilamenten für die MV-Partikelmorphogenese wird jedoch durch die Assoziation von Aktin mit dem RNP-Komplex, der Verpackung von Aktin in das Virion und die Sensitivität der MV-Produktion gegenüber Cytochalasin B und D belegt [208, 209].

Die HIV-induzierte VS weist eine organisierte Struktur auf, in der nicht nur die viralen Proteine / Partikel und Rezeptoren, sondern auch Adhäsionsmoleküle und Tetraspanine polarisieren. Um die Architektur der MV-induzierten VS zu untersuchen, wurde die Polarisierung verschiedener Proteine zur MV-VS bestimmt. Die Adhäsionsmoleküle ICAM-1 und dessen Ligand, das aktivierte LFA-1, akkumulierten signifikant an der Kontaktfläche zwischen MV-DCs und präaktivierten T-Zellen (Abb. 4-31). Die Funktionen von ICAM-1 in HIV-Konjugaten sind vielfältig. HIV gp120 und die Präsenz von ICAM-1 induzieren den T-Zell-Arrest, der die Voraussetzung für die Ausbildung einer VS ist [99]. Zusätzlich stabilisiert ICAM-1 durch Interaktion mit seinem Liganden LFA-1 die VS [104, 121]. Um effizient mit ICAM-1 zu interagieren, muss LFA-1 aktiviert sein [145]. Die T-Zell-Aktivierung durch die Bindung des pMHC-Komplexes an den TCR oder durch HIV gp120 induziert die Konversion von LFA-1

Diskussion

in seine aktive Form [146, 147]. Der in den Experimenten verwendete Antikörper NKI-L16 erkennt spezifisch nur die aktive LFA-1 α -Untereinheit [148]. Es wurde jedoch gezeigt, dass MV-kontaktierte T-Zellen schlechter auf Fibronectin (FN)-beschichteten Objektträgern adhären [24]. Die Bindung von Zellen an Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM), z.B. FN, wird durch β 1-Integrine vermittelt. β 2-Integrine wie LFA-1 sind für die Stabilisierung von Zell-Zell-Kontakten erforderlich. Die mögliche Inhibition der Aktivierung β 1-Integrine ist jedoch nur transient, weil 24 h nach Infektion sowohl aktivierte β 1- als auch β 2-Integrine auf T-Zellen nachgewiesen werden konnten [210]. Zudem herrscht zwischen den Integrinen ein *crosstalk* - LFA-1 stimuliert die Aktivierung von VLA-4 (β 1-Integrin) und VLA-4 trägt zur Aktivierung von LFA-1 bei [211, 212]. Die Detektion des aktivierten LFA-1 in der MV-VS lässt auf eine kontaktinduzierte oder kostimulatorische Aktivierung auf konjugierten T-Zellen schließen, die möglicherweise durch die MV-Glykoproteine erfolgt. Wahrscheinlich induzieren infizierte DCs durch die Expression viraler Proteine und kostimulatorischer Moleküle die Aktivierung von LFA-1, die in Experimenten mit zellfreien MV-kontaktierten T-Zellen fehlen. Um die Aktivierung von β 1-Integrinen zu analysieren, könnten konjugierte T-Zellen im Durchflusszytometer untersucht werden.

Der Anheftungsrezeptor DC-SIGN unterstützt die Infektion von MV und HIV sowie den HIV-Transfer [20, 26, 149]. In Übereinstimmung mit HIV-VS akkumulierte DC-SIGN in der MV-VS (Abb. 4-32A) [123]. Über die genaue Funktion von DC-SIGN in der VS wird jedoch noch spekuliert. DC-SIGN könnte durch die Interaktion mit ICAM-3 auf der T-Zelle die VS stabilisieren [82] und die produzierten Viruspartikel auf der Oberfläche innerhalb der VS konzentrieren, um die Transmission zu verstärken. Zusätzlich könnte DC-SIGN die HIV-VS durch Signalaktivierung regulieren [123]. Durch die initiale Bindung des HIV-Glykoproteins Env an DC-SIGN werden die Rho GTPase Cdc42 und die Bildung von Membranextensionen aktiviert [124]. Möglicherweise induzieren die Glykoproteine des MVs durch die Bindung an DC-SIGN die gleichen Signalwege, zuerst während des Eintritts und später, wenn produzierte Viruspartikel in den synaptischen Spalt freigesetzt werden und erneut an DC-SIGN binden.

Die IS unterscheidet sich von der VS durch eine Antigenerkennung und die damit einhergehende Interaktion von pMHC-Molekülen und TCR sowie der Polarisierung von CD3 im cSMAC. Die IS ist über Stunden stabil, während die Konjugatbildung in Abwesenheit der Antigenerkennung zwischen einer HIV-infizierten und Zielzelle transient und kurzlebig ist [101, 213]. Die Bindung von ICAM-1 an LFA-1 ist essentiell für die Ausbildung einer IS *in vitro* als auch *in vivo* und erhöht 100-fach die Sensitivität der Antigenerkennung durch T-

Diskussion

Zellen [102, 214]. Die ICAM-1 / LFA-1 – Interaktion stabilisiert die HIV-VS und ermöglicht den Virus-Transfer [215]. Ausgehend von der Bedeutung der ICAM-1 / LFA-1 – Interaktion für die Stabilität der HIV-VS, könnten diese Moleküle auch die DC / T-Zell-Konjugate für den MV-Transfer stabilisieren. Eine mögliche Interaktion von DC-SIGN und ICAM-3 könnte zusätzlich zur transienten Stabilität beitragen. In weiteren Experimenten müsste die funktionale Bedeutung der ICAM-1 / LFA-1- sowie DC-SIGN / ICAM-3-Interaktion auf die Konjugatstabilität und MV-Transmission entweder durch spezifische Antikörper-Blockierung oder RNA-Interferenz untersucht werden. Es ist nicht ausgeschlossen, dass bisher nicht beschriebene Moleküle die transienten Konjugate für die Transmissionszeit aufrechterhalten.

Die transiente Expression des Substanz P Rezeptors (SPR) in Jurkat-Zellen steigerte die MV-Infektionsraten [152], so dass eine Rolle von SPR als Ko-Rezeptor, der das MV F-Protein bindet, zu vermuten ist. SPR ist ein Transmembranprotein, welches auf Zellen des Immunsystems, z.B. PBMCs und Lymphozyten, sowie des Nervensystems, z.B. Mikroglia, exprimiert wird [216]. Die Analyse der subzellulären Verteilung ergab, dass SPR in T-Zellen in der MV-VS akkumulierte (Abb. 4-32B). SPR könnte den MV-Eintritt und die Zell-Zell-Transmission an T-Zellen und Neuronen unterstützen und so eine aktive Rolle spielen [151]. Die Aminosäuresequenzähnlichkeit der Substanz P (Phe-Phe-Gly) mit FIP (Z-D-Phe-L-Phe-Gly) und dem N-terminalen hydrophoben MV F1-Fusionsdomäne (Phe-Ala-Gly) lässt auf eine Interaktion des F-Proteins mit SPR schließen, die in eine erhöhte Fusionsaktivität resultiert [217]. Die Akkumulation von SPR in der MV-VS könnte den Transfer von RNP-Komplexen durch Mikrofusionen unterstützen [151]. Es ist wichtig zu unterstreichen, dass für die MV-Transmission nicht zwingend MV-Partikel benötigt werden, sondern der Transfer von RNP-Komplexen ausreichend ist, wie die MV-Transmission über den transsynaptischen Spalt in Neuronen postuliert wird. Um diese Möglichkeit der Transmission zu untersuchen, müssten Immuno-Elektronenmikroskopische Aufnahmen durchgeführt werden, in denen der RNP-Komplex durch Färbung des N-Proteins detektiert wird. Dies ist notwendig, weil DCs auch einfache Membranvesikel (Exosomen) abgeben [218], die MV morphologisch sehr ähnlich sind.

Die Mitglieder der Tetraspaninfamilie assoziieren lateral miteinander und bilden tetraspannreiche Mikrodomänen (TEMs) [136], die unter anderem als Ort der HIV-Freisetzung dienen [139]. Außerdem wurde CD81 als Eintrittsrezeptor für Hepatitis C Virus detektiert [219, 220]. CD81-Lokalisationsstudien in APC / T-Zell-IS zeigten, dass CD81 in der T-Zelle und in der APC im cSMAC akkumulierte [221]. In Übereinstimmung mit HIV relokalierte CD81 in die

Diskussion

MV-VS, die zwischen einer MV-DC und präaktivierten T-Zelle gebildet wurde (Abb. 4-33A) [119]. Um die Bedeutung der Umverteilung zu analysieren, wurde ein Transmissionsexperiment durchgeführt. Die CD81-Blockierung durch spezifische Antikörper reduzierte die Frequenz CD3⁺/GFP⁺ T-Zellen um 25% (Abb. 4-33B). Die Publikationen, die die funktionelle Bedeutung von CD81 während der HIV-Transmission untersuchten, sind widersprüchlich. Die shRNA vermittelte Herunterregulierung der Expression von CD81, nicht jedoch von CD9 oder CD63, auf HIV-produzierenden Zellen verstärkt die Zell-Zell-Transmission von HIV [107]. Andererseits reduziert die CD81-Hemmung nicht nur die VS-Ausbildung, sondern bereits die Konjugatbildung [105]. Ob die Polykonjugatbildung oder die Ausbildung der MV-VS durch die Blockierung von CD81 beeinträchtigt war, muss untersucht werden. Wahrscheinlich ist die Reduktion der Transmission konzentrationsabhängig, so dass eine Erhöhung der eingesetzten CD81-Antikörperkonzentration eine stärkere Reduktion der Transmission zur Folge hätte. Zusätzlich könnte die Bedeutung von CD81 bzw. der Tetraspanine im Allgemeinen auf der T-Zelle untersucht werden. Infolge der T-Zell-Aktivierung wird CD81 heraufreguliert [222]. CD81 formt Komplexe mit den Oberflächenproteinen CD4, CD8 [223], β 1-Integrinen und mit Signalproteinen wie z.B. Proteinkinase C und Phosphatidylinositol-4-Kinase [224, 225] und könnte dadurch die Bildung von Signalkomplexen fördern und stabilisieren [226]. Um die Funktion von CD81 auf der T-Zelle während der MV-Transmission zu untersuchen, könnten funktionelle Transmissionsassays mit präaktivierten T-Zellen durchgeführt werden, die zuvor mit CD81-spezifischen Antikörper präinkubiert wurden oder auf denen CD81 nach Transfektion von siRNA spezifisch herunterreguliert wurde.

Die Polarisierung von F-Aktin in der T-Zelle ist bedeutend für die HIV Env-induzierte Umverteilung von CD4, CXCR4 und LFA-1 in der HIV-VS [103] sowie für die Akkumulation von CD150 in MV-VS (Abb. 4-30). Die Bindung von HIV-Env an CD4 aktiviert Moesin des Ezrin / Radixin / Moesin (ERM)-Komplexes, der die Ko-Rekrutierung von CD4 und CXCR4 fördert [153]. Aktive ERM-Komplexe koppeln Transmembran- und zytoplasmatische Proteine an F-Aktin und begünstigen deren Membranrekrutierung [144]. Moesin und pERM akkumulierten in der MV-VS, jedoch assoziierte pERM deutlicher mit der Kontaktfläche als Moesin. Frühere Experimente mit dem MV-Vakzinestamm zeigten bereits einen Zusammenhang zwischen Moesin und der Suszeptibilität für MV, denn Moesin assoziierte physisch mit CD46 [154, 155]. Daher kann man spekulieren, dass die Akkumulation von Moesin eine funktionale Bedeutung für die Transmission hat und den Eintritt des MVs unterstützt. Die generelle Funk-

Diskussion

tion von CD46 und die Regulation von Moesin in MV-Wildtypstamm-induzierten Polykonjugaten ist noch nicht analysiert worden.

Die Interaktion von MV-Glykoproteine mit T-Zellen reguliert kontaktabhängig T-Zell-Signale. Die Aktivierung des Phosphatidyl-inositol-3-Kinase (PI3K/Akt-Kinase)-Signalweg nach CD3/CD28 oder IL2-R-Ligation ist kurz nach MV-Kontakt inhibiert [22]. Damit einhergehend ist die T-Zell-Aktivierung und die Aktindynamik, insbesondere Adhärenz und Polarisation, gestört [24, 227, 228]. Das MV-Signal führt zusätzlich zur Aktivierung von ASM und NSM und der Akkumulation von Ceramiden auf T-Zellen, die im Einklang stehen mit der beobachteten MV Signal-induzierten Inhibition der Akt-Kinase-Aktivierung, zur Dephosphorylierung von ERM-Proteinen, einer Aktivierung von RhoA und einem Kollaps von aktinreichen Mikrovilli in Abwesenheit von externen Stimuli [24, 25]. Die Akkumulation von pERM in der MV-VS könnte bedeuten, dass das inhibitorische Signal bis zur Ausbildung der VS erloschen ist. Zu Beginn der Konjugatbildung könnte das MV-Signal, das die Dephosphorylierung des pERM begleitet, von der Cofilin-Aktivierung induziert, möglicherweise die Ausbildung von Kontaktflächen durch Reorganisation von Aktin begünstigen.

Zusammenfassend zeigte diese Arbeit, dass die MV-Transmission hauptsächlich durch die Bildung von Kontaktflächen, entsprechend den beschriebenen virologischen Synapsen, an denen virale Proteine akkumulierten und an die CD150 aktinabhängig polarisierte, und seltener über aktinreiche Filopodien erfolgte. Die kooperative Ausbildung einer organisierten Kontaktfläche (MV-VS) für die MV-Transmission ist besonders bedeutend im Hinblick auf die limitierte Fähigkeit der Virusproduktion von DCs. Außer den viralen Proteinen und dem MV-Eintrittsrezeptor CD150 akkumulierten Moleküle in der MV-induzierten VS, die Virus-Transmission und den MV-Eintritt fördern, z.B. durch die Stabilisierung der VS oder die Reorganisation des Aktinzytoskeletts, und damit das Clustern des Eintrittsrezeptors an der Kontaktfläche unterstützen (Abb. 5-1).

Diskussion

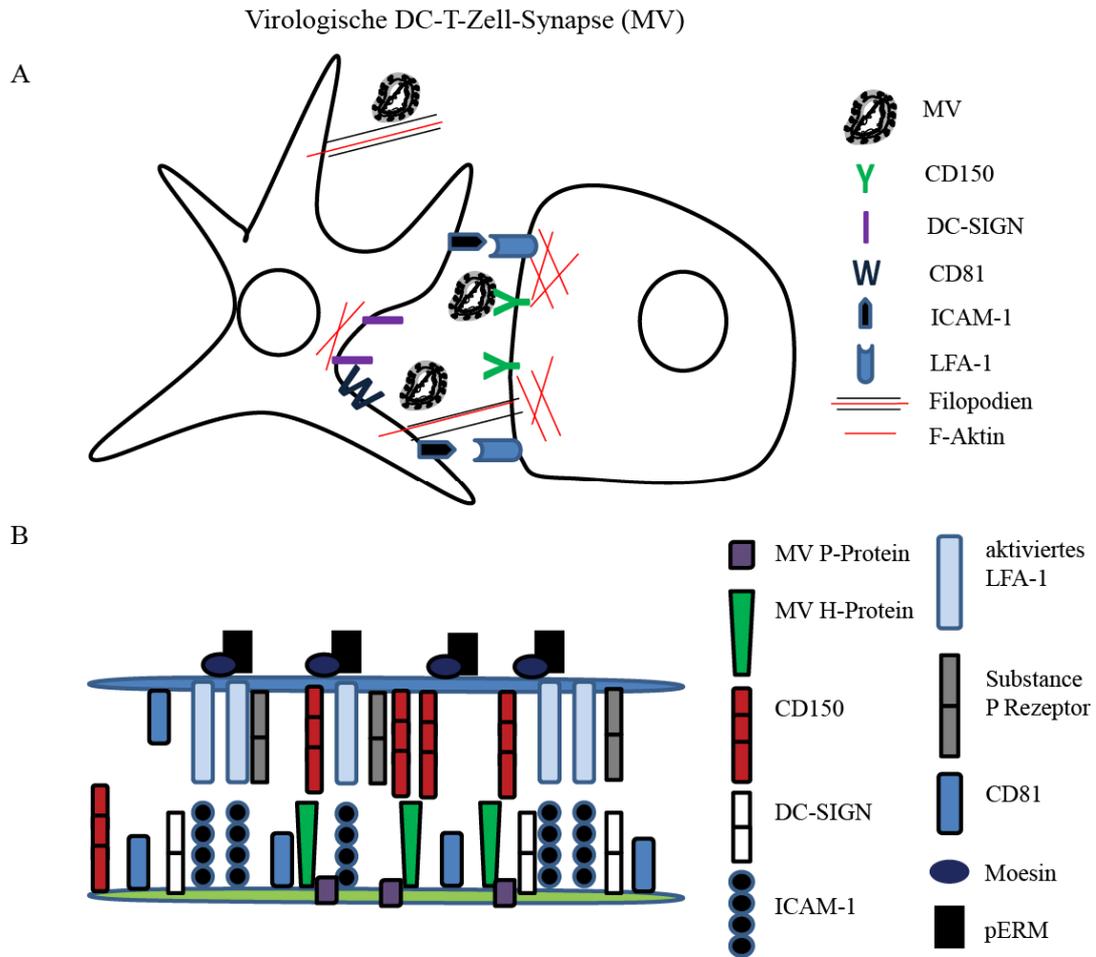


Abb. 5-1: Schematische Darstellung der hypothetischen MV-induzierten Virologischen Synapse. (A) Simplifizierte Darstellung der MV-DC / T-Zell-Synapse (modifizierte Abbildung aus Lehmann et al., 2011, Viruses), (B) Aufbau der MV-VS (modifizierte Abbildung von Jolly and Sattentau, 2004, Traffic). Es sollte jedoch beachtet werden, dass anstelle von Viruspartikeln auch RNP-Komplexe durch Mikrofusion transferiert werden könnten, die in dieser Abb. nicht dargestellt wurden.

6 Zusammenfassung

Dendritische Zellen (DCs) sind Antigen-präsentierende Zellen, die Pathogene erkennen und nach erfolgreicher Reifung spezifische adaptive Immunität induzieren. Die Infektion unreifer DCs durch Masernviren (MV) erfolgt CD150-abhängig und DC-SIGN-unterstützt. Infizierte DCs vermitteln wahrscheinlich den MV-Transport vom Respirationstrakt in sekundäre lymphatische Gewebe, wo die MV-spezifische Immunität und die generalisierte Immunsuppression initiiert werden sowie die MV-Transmission an T-Zellen stattfinden kann, die wesentlich für die Dissemination des Virus ist.

Die MV-Infektion von iDCs initiierte deren Ausreifung begleitet von der moderaten Hochregulierung der CD150-Oberflächenexpression. Die Akkumulation viraler Proteine als auch die Freisetzung viraler Partikel waren in DCs im Vergleich zu Virus-produzierenden B-Zelllinie B95a beeinträchtigt. Diese Arbeit verglich die subzelluläre Verteilung der viralen Proteine in DCs und B95a-Zellen. In DC wiesen Matrix (M)-Proteine eine prominente Assoziation mit den Komponenten des Ribonukleoprotein (RNP)-Komplexes auf. Die ausgeprägte Relokalisierung des Tetraspanins CD81 zu Phospho (P)-Protein-Kompartimenten und die Inhibition der räumliche Interaktion der untersuchten Tetraspanine waren spezifisch für B95a-Zellen. Weder in B95a-Zellen noch für DC konnte für MV ein *virus-containing compartment* (VCC) detektiert werden, das für HIV-1 zuvor beschrieben wurde.

Um den zellulären Transport des M-Proteins in infizierten, lebenden DCs untersuchen zu können, wurde das Protein carboxyterminal mit dem Tetracystein (TC)-Tag fusioniert. Das M-TC Fusionsprotein zeigte alle untersuchten biologischen Eigenschaften des Wildtyp-Proteins bezüglich seiner subzellulären Verteilung, der Assoziation mit DRMs sowie der Generierung und Freisetzung von *virus-like particles* (VPLs). Innerhalb des Viruskontextes interferierte der TC-Tag allerdings stark mit der Virusreplikation bzw. Freisetzung.

Durch die Verminderung der Partikelproduktion in DCs wird eine spezielle MV-Transmissionsstruktur für die effiziente Übertragung an T-Zellen benötigt. Die MV-Transmission an autologe T-Zellen basierte vorwiegend auf Infektion von DCs (*cis*-Infektion) und weniger auf DC-SIGN-gebundenen Virus (*trans*-Infektion). Die Interaktion zwischen dem MV-Glykoprotein H mit seinem Rezeptor CD150 war wichtig für die Transmission. Die Transmission von MV erfolgte hauptsächlich durch die Bildung von Kontaktflächen, entsprechend den beschriebenen virologischen Synapsen, wo virale Proteine akkumulierten und

Zusammenfassung

CD150 aktinabhängig rekrutiert wurde, und seltener über aktinreiche Filopodien. Die HIV-VS Markerproteine ICAM-1, aktiviertes LFA-1, CD81, DC-SIGN und der phosphorylierte Ezrin / Radixin / Moesin (ERM)-Proteinkomplex polarisierten zur MV-VS. Moesin und der Substanz P Rezeptor (SPR), die Prozesse des MV-Eintritts oder der Aufnahme unterstützen, akkumulierten ebenfalls in den Transmissionsstrukturen. Zusammengefasst zeigte diese Arbeit, dass die gebildete Plattform für MV-Transmission (MV-VS) wichtige Gemeinsamkeiten mit der HIV-VS teilt. In der MV-VS akkumulierten Proteine, die Aktindynamiken regulieren, die die Konjugatstabilität verstärken und die die Membranfusion unterstützen, die einen effizienten Eintritt des MV in T-Zellen ermöglichen.

7 Summary

Dendritic cells (DCs) are antigen-presenting cells (APCs) that recognise pathogens and upon maturation induce specific adaptive immunity. Measles virus (MV) infects human immature DCs in a CD150- and DC-SIGN-dependent manner. Infected DCs possibly mediate MV transport from the respiratory tract to secondary lymphatics where induction of MV-specific immunity, generalized immunosuppression and MV transmission to T lymphocytes occurs, which is essential for viral dissemination.

MV infection of DCs was accompanied by DC maturation and moderate upregulation of CD150 surface display. The accumulation of viral proteins and the release of infectious particles were restricted in DCs as compared to the MV producing B cell line B95a. This work compared subcellular distribution of viral proteins in DCs in B95a cells. The association of the matrix (M) protein with components of the ribonucleoprotein (RNP) complex was more prominent in DCs. The distinctive redistribution of CD81 to P protein compartments as well as the inhibition of spatial tetraspanin interaction was confined to B95a cells. A virus containing compartment (VCC) as described for HIV-1 earlier was neither detectable for MV in DCs nor in B95a cells.

To monitor intracellular trafficking of *de novo* synthesised M protein in infected DCs, a tetra-cysteine (TC)-tag was fused to the c-terminus of the M protein. The M-TC fusion protein did not differ from the unmodified protein with regard to all biological properties examined such as intracellular distribution, DRM association and formation and release of virus like particles (VPLs). In the context of virus infection, the tag strongly interfered with virus replication and/or release.

Because MV production is restricted in DCs, these require an organized structure for virus transmission to T cells. MV transmission to autologous T cells mainly relied on the DC infection (referred to as *cis*-infection) while MV trapping by DC-SIGN and subsequent transmission (referred to as *trans*-infection) played a minor role. Transmission essentially involved interaction between the viral glycoprotein H with its receptor CD150. In addition to rare association with actin rich filopodial structures, viral proteins accumulated at DC/T cell contact interfaces consistent with that of the virological synapse (VS) to which also CD150 was recruited in an actin dependent manner. The HIV VS marker proteins ICAM-1, activated LFA-1, CD81, DC-SIGN and phosphorylated ezrin / radixin / moesin (ERM) protein complex also

Summary

redistributed towards the MV VS. Moesin and substance P receptor which were implicated in assisting in MV entry earlier, also accumulated in the transmission structure. Taking together, this work showed that the forming platforms for MV transmission (MV VS) shares similarities with the HIV VS where proteins accumulate that may regulate actin dynamics, enhance conjugate stability and facilitate membrane fusion as required for efficient entry of MV into target T cells.

8 Literaturverzeichnis

1. de Swart, R.L., et al., *Predominant infection of CD150+ lymphocytes and dendritic cells during measles virus infection of macaques*. PLoS Pathog, 2007. **3**(11): p. e178.
2. Lemon, K., et al., *Early target cells of measles virus after aerosol infection of non-human primates*. PLoS Pathog, 2011. **7**(1): p. e1001263.
3. Riddell, M.A., et al., *Slow clearance of measles virus RNA after acute infection*. J Clin Virol, 2007. **39**(4): p. 312-7.
4. Connolly, J.H., et al., *Measles-virus antibody and antigen in subacute sclerosing panencephalitis*. Lancet, 1967. **1**(7489): p. 542-4.
5. Rima, B.K. and W.P. Duprex, *Morbilliviruses and human disease*. J Pathol, 2006. **208**(2): p. 199-214.
6. Billeter, M.A., et al., *Generation and properties of measles virus mutations typically associated with subacute sclerosing panencephalitis*. Ann N Y Acad Sci, 1994. **724**: p. 367-77.
7. Cattaneo, R., et al., *Accumulated measles virus mutations in a case of subacute sclerosing panencephalitis: interrupted matrix protein reading frame and transcription alteration*. Virology, 1986. **154**(1): p. 97-107.
8. Ayata, M., A. Hirano, and T.C. Wong, *Structural defect linked to nonrandom mutations in the matrix gene of biken strain subacute sclerosing panencephalitis virus defined by cDNA cloning and expression of chimeric genes*. J Virol, 1989. **63**(3): p. 1162-73.
9. Permar, S.R., et al., *Increased thymic output during acute measles virus infection*. J Virol, 2003. **77**(14): p. 7872-9.
10. Schneider-Schaulies, S., et al., *Regulation of gene expression in lymphocytes and antigen-presenting cells by measles virus: consequences for immunomodulation*. J Mol Med (Berl), 2002. **80**(2): p. 73-85.
11. Greenstein, J.I. and H.F. McFarland, *Response of human lymphocytes to measles virus after natural infection*. Infect Immun, 1983. **40**(1): p. 198-204.
12. Griffin, D.E., *Measles virus-induced suppression of immune responses*. Immunol Rev, 2010. **236**: p. 176-89.
13. Mikhalap, S.V., et al., *The adaptor protein SH2D1A regulates signaling through CD150 (SLAM) in B cells*. Blood, 2004. **104**(13): p. 4063-70.
14. Boussaad, I., et al., *Wild-type measles virus interferes with short-term engraftment of human CD34+ hematopoietic progenitor cells*. J Virol, 2011. **85**(15): p. 7710-8.
15. Griffin, D.E. and B.J. Ward, *Differential CD4 T cell activation in measles*. J Infect Dis, 1993. **168**(2): p. 275-81.
16. Karp, C.L., et al., *Mechanism of suppression of cell-mediated immunity by measles virus*. Science, 1996. **273**(5272): p. 228-31.
17. Grosjean, I., et al., *Measles virus infects human dendritic cells and blocks their allostimulatory properties for CD4+ T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 801-12.
18. Fugier-Vivier, I., et al., *Measles virus suppresses cell-mediated immunity by interfering with the survival and functions of dendritic and T cells*. J Exp Med, 1997. **186**(6): p. 813-23.
19. McChesney, M.B., A. Altman, and M.B. Oldstone, *Suppression of T lymphocyte function by measles virus is due to cell cycle arrest in G1*. J Immunol, 1988. **140**(4): p. 1269-73.

Literaturverzeichnis

20. de Witte, L., et al., *DC-SIGN and CD150 have distinct roles in transmission of measles virus from dendritic cells to T-lymphocytes*. PLoS Pathog, 2008. **4**(4): p. e1000049.
21. Shishkova, Y., et al., *Immune synapses formed with measles virus-infected dendritic cells are unstable and fail to sustain T cell activation*. Cell Microbiol, 2007. **9**(8): p. 1974-86.
22. Avota, E., et al., *Disruption of Akt kinase activation is important for immunosuppression induced by measles virus*. Nat Med, 2001. **7**(6): p. 725-31.
23. Brennan, P., et al., *Phosphatidylinositol 3-kinase couples the interleukin-2 receptor to the cell cycle regulator E2F*. Immunity, 1997. **7**(5): p. 679-89.
24. Muller, N., et al., *Measles virus contact with T cells impedes cytoskeletal remodeling associated with spreading, polarization, and CD3 clustering*. Traffic, 2006. **7**(7): p. 849-58.
25. Gassert, E., et al., *Induction of membrane ceramides: a novel strategy to interfere with T lymphocyte cytoskeletal reorganisation in viral immunosuppression*. PLoS Pathog, 2009. **5**(10): p. e1000623.
26. de Witte, L., et al., *Measles virus targets DC-SIGN to enhance dendritic cell infection*. J Virol, 2006. **80**(7): p. 3477-86.
27. Erlenhoefer, C., et al., *CD150 (SLAM) is a receptor for measles virus but is not involved in viral contact-mediated proliferation inhibition*. J Virol, 2001. **75**(10): p. 4499-505.
28. Naniche, D., et al., *Human membrane cofactor protein (CD46) acts as a cellular receptor for measles virus*. J Virol, 1993. **67**(10): p. 6025-32.
29. Hsu, E.C., et al., *A single amino acid change in the hemagglutinin protein of measles virus determines its ability to bind CD46 and reveals another receptor on marmoset B cells*. J Virol, 1998. **72**(4): p. 2905-16.
30. Dorig, R.E., et al., *The human CD46 molecule is a receptor for measles virus (Edmonston strain)*. Cell, 1993. **75**(2): p. 295-305.
31. Noyce, R.S., et al., *Tumor cell marker PVRL4 (nectin 4) is an epithelial cell receptor for measles virus*. PLoS Pathog, 2011. **7**(8): p. e1002240.
32. Muhlebach, M.D., et al., *Adherens junction protein nectin-4 is the epithelial receptor for measles virus*. Nature, 2011. **480**(7378): p. 530-3.
33. Hashiguchi, T., et al., *Structure of the measles virus hemagglutinin bound to its cellular receptor SLAM*. Nat Struct Mol Biol, 2011. **18**(2): p. 135-41.
34. Cathomen, T., et al., *A matrix-less measles virus is infectious and elicits extensive cell fusion: consequences for propagation in the brain*. EMBO J, 1998. **17**(14): p. 3899-908.
35. Cathomen, T., H.Y. Naim, and R. Cattaneo, *Measles viruses with altered envelope protein cytoplasmic tails gain cell fusion competence*. J Virol, 1998. **72**(2): p. 1224-34.
36. Naim, H.Y., E. Ehler, and M.A. Billeter, *Measles virus matrix protein specifies apical virus release and glycoprotein sorting in epithelial cells*. EMBO J, 2000. **19**(14): p. 3576-85.
37. Runkler, N., et al., *Measles virus nucleocapsid transport to the plasma membrane requires stable expression and surface accumulation of the viral matrix protein*. Cell Microbiol, 2007. **9**(5): p. 1203-14.
38. Reuter, T., et al., *RNA interference with measles virus N, P, and L mRNAs efficiently prevents and with matrix protein mRNA enhances viral transcription*. J Virol, 2006. **80**(12): p. 5951-7.

Literaturverzeichnis

39. Lund, G.A., et al., *The molecular length of measles virus RNA and the structural organization of measles nucleocapsids*. J Gen Virol, 1984. **65 (Pt 9)**: p. 1535-42.
40. Barr, J.N., S.P. Whelan, and G.W. Wertz, *Transcriptional control of the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus*. Biochim Biophys Acta, 2002. **1577(2)**: p. 337-53.
41. Ferron, F., et al., *Viral RNA-polymerases -- a predicted 2'-O-ribose methyltransferase domain shared by all Mononegavirales*. Trends Biochem Sci, 2002. **27(5)**: p. 222-4.
42. Horikami, S.M. and S.A. Moyer, *Structure, transcription, and replication of measles virus*. Curr Top Microbiol Immunol, 1995. **191**: p. 35-50.
43. Reutter, G.L., et al., *Mutations in the measles virus C protein that up regulate viral RNA synthesis*. Virology, 2001. **285(1)**: p. 100-9.
44. Bankamp, B., et al., *Identification of naturally occurring amino acid variations that affect the ability of the measles virus C protein to regulate genome replication and transcription*. Virology, 2005. **336(1)**: p. 120-9.
45. Yokota, S., et al., *Measles virus suppresses interferon-alpha signaling pathway: suppression of Jak1 phosphorylation and association of viral accessory proteins, C and V, with interferon-alpha receptor complex*. Virology, 2003. **306(1)**: p. 135-46.
46. Shaffer, J.A., W.J. Bellini, and P.A. Rota, *The C protein of measles virus inhibits the type I interferon response*. Virology, 2003. **315(2)**: p. 389-97.
47. Schuhmann, K.M., C.K. Pfaller, and K.K. Conzelmann, *The measles virus V protein binds to p65 (RelA) to suppress NF-kappaB activity*. J Virol, 2011. **85(7)**: p. 3162-71.
48. Kawai, T. and S. Akira, *Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling*. Ann N Y Acad Sci, 2008. **1143**: p. 1-20.
49. Palosaari, H., et al., *STAT protein interference and suppression of cytokine signal transduction by measles virus V protein*. J Virol, 2003. **77(13)**: p. 7635-44.
50. Takeuchi, K., et al., *Measles virus V protein blocks interferon (IFN)-alpha/beta but not IFN-gamma signaling by inhibiting STAT1 and STAT2 phosphorylation*. FEBS Lett, 2003. **545(2-3)**: p. 177-82.
51. Rima, B.K. and W.P. Duprex, *The measles virus replication cycle*. Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **329**: p. 77-102.
52. Bellini, W.J., et al., *Measles virus P gene codes for two proteins*. J Virol, 1985. **53(3)**: p. 908-19.
53. Cattaneo, R., et al., *Measles virus editing provides an additional cysteine-rich protein*. Cell, 1989. **56(5)**: p. 759-64.
54. Plumet, S., W.P. Duprex, and D. Gerlier, *Dynamics of viral RNA synthesis during measles virus infection*. J Virol, 2005. **79(11)**: p. 6900-8.
55. Bellini, W.J., et al., *Matrix genes of measles virus and canine distemper virus: cloning, nucleotide sequences, and deduced amino acid sequences*. J Virol, 1986. **58(2)**: p. 408-16.
56. Tahara, M., M. Takeda, and Y. Yanagi, *Contributions of matrix and large protein genes of the measles virus edmonston strain to growth in cultured cells as revealed by recombinant viruses*. J Virol, 2005. **79(24)**: p. 15218-25.
57. Dong, J.B., et al., *Adaptation of wild-type measles virus to cotton rat lung cells: E89K mutation in matrix protein contributes to its fitness*. Virus Genes, 2009. **39(3)**: p. 330-4.
58. Suryanarayana, K., et al., *Transcription inhibition and other properties of matrix proteins expressed by M genes cloned from measles viruses and diseased human brain tissue*. J Virol, 1994. **68(3)**: p. 1532-43.

Literaturverzeichnis

59. Pohl, C., et al., *Measles virus M and F proteins associate with detergent-resistant membrane fractions and promote formation of virus-like particles*. J Gen Virol, 2007. **88**(Pt 4): p. 1243-50.
60. Iwasaki, M., et al., *The matrix protein of measles virus regulates viral RNA synthesis and assembly by interacting with the nucleocapsid protein*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10374-83.
61. Plemper, R.K., et al., *Strength of envelope protein interaction modulates cytopathicity of measles virus*. J Virol, 2002. **76**(10): p. 5051-61.
62. Tahara, M., M. Takeda, and Y. Yanagi, *Altered interaction of the matrix protein with the cytoplasmic tail of hemagglutinin modulates measles virus growth by affecting virus assembly and cell-cell fusion*. J Virol, 2007. **81**(13): p. 6827-36.
63. Riedl, P., et al., *Measles virus matrix protein is not cotransported with the viral glycoproteins but requires virus infection for efficient surface targeting*. Virus Res, 2002. **83**(1-2): p. 1-12.
64. Manie, S.N., et al., *Measles virus structural components are enriched into lipid raft microdomains: a potential cellular location for virus assembly*. J Virol, 2000. **74**(1): p. 305-11.
65. Plemper, R.K., A.L. Hammond, and R. Cattaneo, *Measles virus envelope glycoproteins hetero-oligomerize in the endoplasmic reticulum*. J Biol Chem, 2001. **276**(47): p. 44239-46.
66. Vincent, S., D. Gerlier, and S.N. Manie, *Measles virus assembly within membrane rafts*. J Virol, 2000. **74**(21): p. 9911-5.
67. Salditt, A., et al., *Measles virus M protein-driven particle production does not involve the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) system*. J Gen Virol, 2010. **91**(Pt 6): p. 1464-72.
68. Martin-Serrano, J., T. Zang, and P.D. Bieniasz, *Role of ESCRT-I in retroviral budding*. J Virol, 2003. **77**(8): p. 4794-804.
69. Tatsuo, H., et al., *SLAM (CDw150) is a cellular receptor for measles virus*. Nature, 2000. **406**(6798): p. 893-7.
70. Murabayashi, N., et al., *Susceptibility of human dendritic cells (DCs) to measles virus (MV) depends on their activation stages in conjunction with the level of CDw150: role of Toll stimulators in DC maturation and MV amplification*. Microbes Infect, 2002. **4**(8): p. 785-94.
71. Kruse, M., et al., *Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on mature CD83+ dendritic cells and is up-regulated by IL-1 beta*. J Immunol, 2001. **167**(4): p. 1989-95.
72. Bleharski, J.R., et al., *Signaling lymphocytic activation molecule is expressed on CD40 ligand-activated dendritic cells and directly augments production of inflammatory cytokines*. J Immunol, 2001. **167**(6): p. 3174-81.
73. Sintes, J. and P. Engel, *SLAM (CDI50) is a multitasking immunoreceptor: from cosignalling to bacterial recognition*. Immunol Cell Biol, 2011. **89**(2): p. 161-3.
74. Hashiguchi, T., et al., *Crystal structure of measles virus hemagglutinin provides insight into effective vaccines*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2007. **104**(49): p. 19535-40.
75. Paal, T., et al., *Probing the spatial organization of measles virus fusion complexes*. J Virol, 2009. **83**(20): p. 10480-93.
76. Hashiguchi, T., K. Maenaka, and Y. Yanagi, *Measles virus hemagglutinin: structural insights into cell entry and measles vaccine*. Front Microbiol, 2011. **2**: p. 247.
77. Plemper, R.K., M.A. Brindley, and R.M. Iorio, *Structural and mechanistic studies of measles virus illuminate paramyxovirus entry*. PLoS Pathog, 2011. **7**(6): p. e1002058.

Literaturverzeichnis

78. McKenna, K., A.S. Beignon, and N. Bhardwaj, *Plasmacytoid dendritic cells: linking innate and adaptive immunity*. J Virol, 2005. **79**(1): p. 17-27.
79. Banchereau, J. and R.M. Steinman, *Dendritic cells and the control of immunity*. Nature, 1998. **392**(6673): p. 245-52.
80. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *Innate immune recognition: mechanisms and pathways*. Immunol Rev, 2000. **173**: p. 89-97.
81. Medzhitov, R. and C. Janeway, Jr., *The Toll receptor family and microbial recognition*. Trends Microbiol, 2000. **8**(10): p. 452-6.
82. Geijtenbeek, T.B., et al., *Identification of DC-SIGN, a novel dendritic cell-specific ICAM-3 receptor that supports primary immune responses*. Cell, 2000. **100**(5): p. 575-85.
83. Birkholz, K., et al., *Targeting of DEC-205 on human dendritic cells results in efficient MHC class II-restricted antigen presentation*. Blood, 2010. **116**(13): p. 2277-85.
84. Sallusto, F., et al., *Dendritic cells use macropinocytosis and the mannose receptor to concentrate macromolecules in the major histocompatibility complex class II compartment: downregulation by cytokines and bacterial products*. J Exp Med, 1995. **182**(2): p. 389-400.
85. Wu, L. and A. Dakic, *Development of dendritic cell system*. Cell Mol Immunol, 2004. **1**(2): p. 112-8.
86. Trombetta, E.S. and I. Mellman, *Cell biology of antigen processing in vitro and in vivo*. Annu Rev Immunol, 2005. **23**: p. 975-1028.
87. Barois, N., et al., *MHC class II compartments in human dendritic cells undergo profound structural changes upon activation*. Traffic, 2002. **3**(12): p. 894-905.
88. van Niel, G., et al., *Dendritic cells regulate exposure of MHC class II at their plasma membrane by oligoubiquitination*. Immunity, 2006. **25**(6): p. 885-94.
89. ten Broeke, T., et al., *Endosomally stored MHC class II does not contribute to antigen presentation by dendritic cells at inflammatory conditions*. Traffic, 2011. **12**(8): p. 1025-36.
90. Lelouard, H., et al., *Dendritic cell aggresome-like induced structures are dedicated areas for ubiquitination and storage of newly synthesized defective proteins*. J Cell Biol, 2004. **164**(5): p. 667-75.
91. Pierre, P., *Dendritic cells, DRiPs, and DALIS in the control of antigen processing*. Immunol Rev, 2005. **207**: p. 184-90.
92. Segura, E. and J.A. Villadangos, *A modular and combinatorial view of the antigen cross-presentation pathway in dendritic cells*. Traffic, 2011. **12**(12): p. 1677-85.
93. Jahnsen, F.L., et al., *Accelerated antigen sampling and transport by airway mucosal dendritic cells following inhalation of a bacterial stimulus*. J Immunol, 2006. **177**(9): p. 5861-7.
94. Klagge, I.M., V. ter Meulen, and S. Schneider-Schaulies, *Measles virus-induced promotion of dendritic cell maturation by soluble mediators does not overcome the immunosuppressive activity of viral glycoproteins on the cell surface*. Eur J Immunol, 2000. **30**(10): p. 2741-50.
95. Servet-Delprat, C., et al., *Measles virus induces abnormal differentiation of CD40 ligand-activated human dendritic cells*. J Immunol, 2000. **164**(4): p. 1753-60.
96. Abt, M., E. Gassert, and S. Schneider-Schaulies, *Measles virus modulates chemokine release and chemotactic responses of dendritic cells*. J Gen Virol, 2009. **90**(Pt 4): p. 909-14.

Literaturverzeichnis

97. Mazurov, D., et al., *Quantitative comparison of HTLV-1 and HIV-1 cell-to-cell infection with new replication dependent vectors*. PLoS Pathog, 2010. **6**(2): p. e1000788.
98. Piguet, V. and Q. Sattentau, *Dangerous liaisons at the virological synapse*. J Clin Invest, 2004. **114**(5): p. 605-10.
99. Vasiliver-Shamis, G., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 envelope gp120 induces a stop signal and virological synapse formation in noninfected CD4+ T cells*. J Virol, 2008. **82**(19): p. 9445-57.
100. Varma, R., et al., *T cell receptor-proximal signals are sustained in peripheral microclusters and terminated in the central supramolecular activation cluster*. Immunity, 2006. **25**(1): p. 117-27.
101. Vasiliver-Shamis, G., M.L. Dustin, and C.E. Hioe, *HIV-1 Virological Synapse is not Simply a Copycat of the Immunological Synapse*. Viruses, 2010. **2**(5): p. 1239-60.
102. Fooksman, D.R., et al., *Functional anatomy of T cell activation and synapse formation*. Annu Rev Immunol, 2010. **28**: p. 79-105.
103. Jolly, C., et al., *HIV-1 cell to cell transfer across an Env-induced, actin-dependent synapse*. J Exp Med, 2004. **199**(2): p. 283-93.
104. Jolly, C., I. Mitar, and Q.J. Sattentau, *Adhesion molecule interactions facilitate human immunodeficiency virus type 1-induced virological synapse formation between T cells*. J Virol, 2007. **81**(24): p. 13916-21.
105. Jolly, C. and Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 assembly, budding, and cell-cell spread in T cells take place in tetraspanin-enriched plasma membrane domains*. J Virol, 2007. **81**(15): p. 7873-84.
106. Jolly, C. and Q.J. Sattentau, *Human immunodeficiency virus type 1 virological synapse formation in T cells requires lipid raft integrity*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 12088-94.
107. Kremontsov, D.N., et al., *Tetraspanins regulate cell-to-cell transmission of HIV-1*. Retrovirology, 2009. **6**: p. 64.
108. Jolly, C., I. Mitar, and Q.J. Sattentau, *Requirement for an intact T-cell actin and tubulin cytoskeleton for efficient assembly and spread of human immunodeficiency virus type 1*. J Virol, 2007. **81**(11): p. 5547-60.
109. Jolly, C., et al., *The regulated secretory pathway in CD4(+) T cells contributes to human immunodeficiency virus type-1 cell-to-cell spread at the virological synapse*. PLoS Pathog, 2011. **7**(9): p. e1002226.
110. Martin, N., et al., *Virological synapse-mediated spread of human immunodeficiency virus type 1 between T cells is sensitive to entry inhibition*. J Virol, 2010. **84**(7): p. 3516-27.
111. Hubner, W., et al., *Quantitative 3D video microscopy of HIV transfer across T cell virological synapses*. Science, 2009. **323**(5922): p. 1743-7.
112. Rudnicka, D., et al., *Simultaneous cell-to-cell transmission of human immunodeficiency virus to multiple targets through polysynapses*. J Virol, 2009. **83**(12): p. 6234-46.
113. Sherer, N.M., et al., *Retroviruses can establish filopodial bridges for efficient cell-to-cell transmission*. Nat Cell Biol, 2007. **9**(3): p. 310-5.
114. Sowinski, S., et al., *Membrane nanotubes physically connect T cells over long distances presenting a novel route for HIV-1 transmission*. Nat Cell Biol, 2008. **10**(2): p. 211-9.
115. Granelli-Piperno, A., et al., *Immature dendritic cells selectively replicate macrophagetropic (M-tropic) human immunodeficiency virus type 1, while mature*

Literaturverzeichnis

- cells efficiently transmit both M- and T-tropic virus to T cells.* J Virol, 1998. **72**(4): p. 2733-7.
116. Turville, S.G., et al., *Immunodeficiency virus uptake, turnover, and 2-phase transfer in human dendritic cells.* Blood, 2004. **103**(6): p. 2170-9.
117. Garcia, E., et al., *HIV-1 trafficking to the dendritic cell-T-cell infectious synapse uses a pathway of tetraspanin sorting to the immunological synapse.* Traffic, 2005. **6**(6): p. 488-501.
118. Yu, H.J., M.A. Reuter, and D. McDonald, *HIV traffics through a specialized, surface-accessible intracellular compartment during trans-infection of T cells by mature dendritic cells.* PLoS Pathog, 2008. **4**(8): p. e1000134.
119. Garcia, E., D.S. Nikolic, and V. Piguet, *HIV-1 replication in dendritic cells occurs through a tetraspanin-containing compartment enriched in AP-3.* Traffic, 2008. **9**(2): p. 200-14.
120. Welsch, S., et al., *Architecture and regulation of the HIV-1 assembly and holding compartment in macrophages.* J Virol, 2011. **85**(15): p. 7922-7.
121. Wang, J.H., C. Kwas, and L. Wu, *Intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1), but not ICAM-2 and -3, is important for dendritic cell-mediated human immunodeficiency virus type 1 transmission.* J Virol, 2009. **83**(9): p. 4195-204.
122. Wang, J.H., C. Wells, and L. Wu, *Macropinocytosis and cytoskeleton contribute to dendritic cell-mediated HIV-1 transmission to CD4+ T cells.* Virology, 2008. **381**(1): p. 143-54.
123. Arrighi, J.F., et al., *DC-SIGN-mediated infectious synapse formation enhances X4 HIV-1 transmission from dendritic cells to T cells.* J Exp Med, 2004. **200**(10): p. 1279-88.
124. Nikolic, D.S., et al., *HIV-1 activates Cdc42 and induces membrane extensions in immature dendritic cells to facilitate cell-to-cell virus propagation.* Blood, 2011. **118**(18): p. 4841-52.
125. Richardson, C.D., A. Scheid, and P.W. Choppin, *Specific inhibition of paramyxovirus and myxovirus replication by oligopeptides with amino acid sequences similar to those at the N-termini of the F1 or HA2 viral polypeptides.* Virology, 1980. **105**(1): p. 205-22.
126. Hoffmann, C., et al., *Fluorescent labeling of tetracysteine-tagged proteins in intact cells.* Nat Protoc, 2010. **5**(10): p. 1666-77.
127. Adams, S.R., et al., *New biarsenical ligands and tetracysteine motifs for protein labeling in vitro and in vivo: synthesis and biological applications.* J Am Chem Soc, 2002. **124**(21): p. 6063-76.
128. Martin, B.R., et al., *Mammalian cell-based optimization of the biarsenical-binding tetracysteine motif for improved fluorescence and affinity.* Nat Biotechnol, 2005. **23**(10): p. 1308-14.
129. Turville, S.G., et al., *Resolution of de novo HIV production and trafficking in immature dendritic cells.* Nat Methods, 2008. **5**(1): p. 75-85.
130. Hashimoto, K., et al., *SLAM (CD150)-independent measles virus entry as revealed by recombinant virus expressing green fluorescent protein.* J Virol, 2002. **76**(13): p. 6743-9.
131. Razzaq, T.M., et al., *Regulation of T-cell receptor signalling by membrane microdomains.* Immunology, 2004. **113**(4): p. 413-26.
132. Ono, A. and E.O. Freed, *Plasma membrane rafts play a critical role in HIV-1 assembly and release.* Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(24): p. 13925-30.

Literaturverzeichnis

133. Bavari, S., et al., *Lipid raft microdomains: a gateway for compartmentalized trafficking of Ebola and Marburg viruses*. J Exp Med, 2002. **195**(5): p. 593-602.
134. Robinson, M.S., *Adaptable adaptors for coated vesicles*. Trends Cell Biol, 2004. **14**(4): p. 167-74.
135. Herter, S., et al., *Dendritic cell aggresome-like-induced structure formation and delayed antigen presentation coincide in influenza virus-infected dendritic cells*. J Immunol, 2005. **175**(2): p. 891-8.
136. Kropshofer, H., et al., *Tetraspan microdomains distinct from lipid rafts enrich select peptide-MHC class II complexes*. Nat Immunol, 2002. **3**(1): p. 61-8.
137. Serru, V., et al., *Selective tetraspan-integrin complexes (CD81/alpha4beta1, CD151/alpha3beta1, CD151/alpha6beta1) under conditions disrupting tetraspan interactions*. Biochem J, 1999. **340** (Pt 1): p. 103-11.
138. Hemler, M.E., *Targeting of tetraspanin proteins--potential benefits and strategies*. Nat Rev Drug Discov, 2008. **7**(9): p. 747-58.
139. Nydegger, S., et al., *Mapping of tetraspanin-enriched microdomains that can function as gateways for HIV-1*. J Cell Biol, 2006. **173**(5): p. 795-807.
140. Deneka, M., et al., *In macrophages, HIV-1 assembles into an intracellular plasma membrane domain containing the tetraspanins CD81, CD9, and CD53*. J Cell Biol, 2007. **177**(2): p. 329-41.
141. Griffin, B.A., S.R. Adams, and R.Y. Tsien, *Specific covalent labeling of recombinant protein molecules inside live cells*. Science, 1998. **281**(5374): p. 269-72.
142. Wu, L. and V.N. KewalRamani, *Dendritic-cell interactions with HIV: infection and viral dissemination*. Nat Rev Immunol, 2006. **6**(11): p. 859-68.
143. Liebert, U.G., et al., *Antigenic determinants of measles virus hemagglutinin associated with neurovirulence*. J Virol, 1994. **68**(3): p. 1486-93.
144. Lehmann, M., D.S. Nikolic, and V. Piguet, *How HIV-1 takes advantage of the cytoskeleton during replication and cell-to-cell transmission*. Viruses, 2011. **3**(9): p. 1757-76.
145. Luo, B.H., C.V. Carman, and T.A. Springer, *Structural basis of integrin regulation and signaling*. Annu Rev Immunol, 2007. **25**: p. 619-47.
146. Mor, A., M.L. Dustin, and M.R. Philips, *Small GTPases and LFA-1 reciprocally modulate adhesion and signaling*. Immunol Rev, 2007. **218**: p. 114-25.
147. Hioe, C.E., et al., *HIV envelope gp120 activates LFA-1 on CD4 T-lymphocytes and increases cell susceptibility to LFA-1-targeting leukotoxin (LtxA)*. PLoS One, 2011. **6**(8): p. e23202.
148. Cambi, A., et al., *Organization of the integrin LFA-1 in nanoclusters regulates its activity*. Mol Biol Cell, 2006. **17**(10): p. 4270-81.
149. Geijtenbeek, T.B., et al., *DC-SIGN, a dendritic cell-specific HIV-1-binding protein that enhances trans-infection of T cells*. Cell, 2000. **100**(5): p. 587-97.
150. Hodges, A., et al., *Activation of the lectin DC-SIGN induces an immature dendritic cell phenotype triggering Rho-GTPase activity required for HIV-1 replication*. Nat Immunol, 2007. **8**(6): p. 569-77.
151. Makhortova, N.R., et al., *Neurokinin-1 enables measles virus trans-synaptic spread in neurons*. Virology, 2007. **362**(1): p. 235-44.
152. Harrowe, G., J. Sudduth-Klinger, and D.G. Payan, *Measles virus-substance P receptor interaction: Jurkat lymphocytes transfected with substance P receptor cDNA enhance measles virus fusion and replication*. Cell Mol Neurobiol, 1992. **12**(5): p. 397-409.

Literaturverzeichnis

153. Barrero-Villar, M., et al., *Moesin is required for HIV-1-induced CD4-CXCR4 interaction, F-actin redistribution, membrane fusion and viral infection in lymphocytes*. J Cell Sci, 2009. **122**(Pt 1): p. 103-13.
154. Dunster, L.M., et al., *Moesin: a cell membrane protein linked with susceptibility to measles virus infection*. Virology, 1994. **198**(1): p. 265-74.
155. Schneider-Schaulies, J., et al., *Physical association of moesin and CD46 as a receptor complex for measles virus*. J Virol, 1995. **69**(4): p. 2248-56.
156. Avota, E., E. Gulbins, and S. Schneider-Schaulies, *DC-SIGN mediated sphingomyelinase-activation and ceramide generation is essential for enhancement of viral uptake in dendritic cells*. PLoS Pathog, 2011. **7**(2): p. e1001290.
157. Bieback, K., et al., *Hemagglutinin protein of wild-type measles virus activates toll-like receptor 2 signaling*. J Virol, 2002. **76**(17): p. 8729-36.
158. Minagawa, H., et al., *Induction of the measles virus receptor SLAM (CD150) on monocytes*. J Gen Virol, 2001. **82**(Pt 12): p. 2913-7.
159. Komune, N., et al., *Measles virus V protein inhibits NLRP3 inflammasome-mediated interleukin-1beta secretion*. J Virol, 2011. **85**(24): p. 13019-26.
160. Welstead, G.G., et al., *Mechanism of CD150 (SLAM) down regulation from the host cell surface by measles virus hemagglutinin protein*. J Virol, 2004. **78**(18): p. 9666-74.
161. Laguette, N., et al., *SAMHD1 is the dendritic- and myeloid-cell-specific HIV-1 restriction factor counteracted by Vpx*. Nature, 2011. **474**(7353): p. 654-7.
162. Lahouassa, H., et al., *SAMHD1 restricts the replication of human immunodeficiency virus type 1 by depleting the intracellular pool of deoxynucleoside triphosphates*. Nat Immunol, 2012. **13**(6): p. 621.
163. Harris, R.S. and M.T. Liddament, *Retroviral restriction by APOBEC proteins*. Nat Rev Immunol, 2004. **4**(11): p. 868-77.
164. Chiu, Y.L., et al., *Cellular APOBEC3G restricts HIV-1 infection in resting CD4+ T cells*. Nature, 2005. **435**(7038): p. 108-14.
165. Pion, M., et al., *APOBEC3G/3F mediates intrinsic resistance of monocyte-derived dendritic cells to HIV-1 infection*. J Exp Med, 2006. **203**(13): p. 2887-93.
166. Fehrholz, M., et al., *The innate antiviral factor APOBEC3G targets replication of measles, mumps and respiratory syncytial viruses*. J Gen Virol, 2012. **93**(Pt 3): p. 565-76.
167. Mussil, B., et al., *Increased APOBEC3G and APOBEC3F expression is associated with low viral load and prolonged survival in simian immunodeficiency virus infected rhesus monkeys*. Retrovirology, 2011. **8**: p. 77.
168. Samady, L., et al., *Deletion of the virion host shutoff protein (vhs) from herpes simplex virus (HSV) relieves the viral block to dendritic cell activation: potential of vhs- HSV vectors for dendritic cell-mediated immunotherapy*. J Virol, 2003. **77**(6): p. 3768-76.
169. Liljeroos, L., et al., *Electron cryotomography of measles virus reveals how matrix protein coats the ribonucleocapsid within intact virions*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(44): p. 18085-90.
170. Bolt, G., *The measles virus (MV) glycoproteins interact with cellular chaperones in the endoplasmic reticulum and MV infection upregulates chaperone expression*. Arch Virol, 2001. **146**(11): p. 2055-68.
171. Quinn, D.J., et al., *Live-cell visualization of transmembrane protein oligomerization and membrane fusion using two-fragment haptoEGFP methodology*. Biosci Rep, 2012. **32**(3): p. 333-43.
172. Dong, X., et al., *AP-3 directs the intracellular trafficking of HIV-1 Gag and plays a key role in particle assembly*. Cell, 2005. **120**(5): p. 663-74.

Literaturverzeichnis

173. Kawada, S., et al., *Dominant negative inhibition of human immunodeficiency virus particle production by the nonmyristoylated form of gag*. J Virol, 2008. **82**(9): p. 4384-99.
174. Raposo, G., et al., *Human macrophages accumulate HIV-1 particles in MHC II compartments*. Traffic, 2002. **3**(10): p. 718-29.
175. Rasmussen, A.M., et al., *CDw78--a determinant on a major histocompatibility complex class II subpopulation that can be induced to associate with the cytoskeleton*. Eur J Immunol, 1997. **27**(12): p. 3206-13.
176. Yanez-Mo, M., et al., *Tetraspanin-enriched microdomains: a functional unit in cell plasma membranes*. Trends Cell Biol, 2009. **19**(9): p. 434-46.
177. Hemler, M.E., *Tetraspanin functions and associated microdomains*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2005. **6**(10): p. 801-11.
178. Khurana, S., et al., *Human immunodeficiency virus type 1 and influenza virus exit via different membrane microdomains*. J Virol, 2007. **81**(22): p. 12630-40.
179. Hogue, I.B., et al., *Gag induces the coalescence of clustered lipid rafts and tetraspanin-enriched microdomains at HIV-1 assembly sites on the plasma membrane*. J Virol, 2011. **85**(19): p. 9749-66.
180. Kovalenko, O.V., et al., *Evidence for specific tetraspanin homodimers: inhibition of palmitoylation makes cysteine residues available for cross-linking*. Biochem J, 2004. **377**(Pt 2): p. 407-17.
181. Metzelaar, M.J., et al., *CD63 antigen. A novel lysosomal membrane glycoprotein, cloned by a screening procedure for intracellular antigens in eukaryotic cells*. J Biol Chem, 1991. **266**(5): p. 3239-45.
182. Pelchen-Matthews, A., B. Kramer, and M. Marsh, *Infectious HIV-1 assembles in late endosomes in primary macrophages*. J Cell Biol, 2003. **162**(3): p. 443-55.
183. Ruiz-Mateos, E., et al., *CD63 is not required for production of infectious human immunodeficiency virus type 1 in human macrophages*. J Virol, 2008. **82**(10): p. 4751-61.
184. Welsch, S., et al., *HIV-1 buds predominantly at the plasma membrane of primary human macrophages*. PLoS Pathog, 2007. **3**(3): p. e36.
185. Murray, J.L., et al., *Rab9 GTPase is required for replication of human immunodeficiency virus type 1, filoviruses, and measles virus*. J Virol, 2005. **79**(18): p. 11742-51.
186. Narita, K., et al., *Protein transduction of Rab9 in Niemann-Pick C cells reduces cholesterol storage*. FASEB J, 2005. **19**(11): p. 1558-60.
187. Berghall, H., et al., *Role of cytoskeleton components in measles virus replication*. Arch Virol, 2004. **149**(5): p. 891-901.
188. Rudner, L., et al., *Dynamic fluorescent imaging of human immunodeficiency virus type 1 gag in live cells by biarsenical labeling*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4055-65.
189. Perlman, M. and M.D. Resh, *Identification of an intracellular trafficking and assembly pathway for HIV-1 gag*. Traffic, 2006. **7**(6): p. 731-45.
190. Gousset, K., et al., *Real-time visualization of HIV-1 GAG trafficking in infected macrophages*. PLoS Pathog, 2008. **4**(3): p. e1000015.
191. Pereira, C.F., et al., *Labeling of multiple HIV-1 proteins with the biarsenical-tetracysteine system*. PLoS One, 2011. **6**(2): p. e17016.
192. Sattentau, Q., *Avoiding the void: cell-to-cell spread of human viruses*. Nat Rev Microbiol, 2008. **6**(11): p. 815-26.

Literaturverzeichnis

193. Burleigh, L., et al., *Infection of dendritic cells (DCs), not DC-SIGN-mediated internalization of human immunodeficiency virus, is required for long-term transfer of virus to T cells.* J Virol, 2006. **80**(6): p. 2949-57.
194. Joseph, B.S., P.W. Lampert, and M.B. Oldstone, *Replication and persistence of measles virus in defined subpopulations of human leukocytes.* J Virol, 1975. **16**(6): p. 1638-49.
195. Vigerust, D.J. and V.L. Shepherd, *Virus glycosylation: role in virulence and immune interactions.* Trends Microbiol, 2007. **15**(5): p. 211-8.
196. Wei, X., et al., *Antibody neutralization and escape by HIV-1.* Nature, 2003. **422**(6929): p. 307-12.
197. Willey, R.L., et al., *Differential glycosylation, virion incorporation, and sensitivity to neutralizing antibodies of human immunodeficiency virus type 1 envelope produced from infected primary T-lymphocyte and macrophage cultures.* J Virol, 1996. **70**(9): p. 6431-6.
198. Eugenin, E.A., P.J. Gaskill, and J.W. Berman, *Tunneling nanotubes (TNT) are induced by HIV-infection of macrophages: a potential mechanism for intercellular HIV trafficking.* Cell Immunol, 2009. **254**(2): p. 142-8.
199. Evangelista, M., S. Zigmond, and C. Boone, *Formins: signaling effectors for assembly and polarization of actin filaments.* J Cell Sci, 2003. **116**(Pt 13): p. 2603-11.
200. Aggarwal, A., et al., *Mobilization of HIV Spread by Diaphanous 2 Dependent Filopodia in Infected Dendritic Cells.* PLoS Pathog, 2012. **8**(6): p. e1002762.
201. Sowinski, S., et al., *Optimized methods for imaging membrane nanotubes between T cells and trafficking of HIV-1.* Methods, 2011. **53**(1): p. 27-33.
202. Young, V.A. and G.F. Rall, *Making it to the synapse: measles virus spread in and among neurons.* Curr Top Microbiol Immunol, 2009. **330**: p. 3-30.
203. Ehrenguber, M.U., et al., *Measles virus spreads in rat hippocampal neurons by cell-to-cell contact and in a polarized fashion.* J Virol, 2002. **76**(11): p. 5720-8.
204. Firsching, R., et al., *Measles virus spread by cell-cell contacts: uncoupling of contact-mediated receptor (CD46) downregulation from virus uptake.* J Virol, 1999. **73**(7): p. 5265-73.
205. Klem, J., et al., *2B4 is constitutively associated with linker for the activation of T cells in glycolipid-enriched microdomains: properties required for 2B4 lytic function.* J Immunol, 2002. **169**(1): p. 55-62.
206. Dupre, L., et al., *SAP controls the cytolytic activity of CD8+ T cells against EBV-infected cells.* Blood, 2005. **105**(11): p. 4383-9.
207. Detre, C., et al., *SLAM family receptors and the SLAM-associated protein (SAP) modulate T cell functions.* Semin Immunopathol, 2010. **32**(2): p. 157-71.
208. Moyer, S.A., S.C. Baker, and S.M. Horikami, *Host cell proteins required for measles virus reproduction.* J Gen Virol, 1990. **71** (Pt 4): p. 775-83.
209. Stallcup, K.C., C.S. Raine, and B.N. Fields, *Cytochalasin B inhibits the maturation of measles virus.* Virology, 1983. **124**(1): p. 59-74.
210. Dittmar, S., et al., *Measles virus-induced block of transendothelial migration of T lymphocytes and infection-mediated virus spread across endothelial cell barriers.* J Virol, 2008. **82**(22): p. 11273-82.
211. Porter, J.C. and N. Hogg, *Integrin cross talk: activation of lymphocyte function-associated antigen-1 on human T cells alters alpha4beta1- and alpha5beta1-mediated function.* J Cell Biol, 1997. **138**(6): p. 1437-47.

Literaturverzeichnis

212. Chan, J.R., S.J. Hyduk, and M.I. Cybulsky, *Alpha 4 beta 1 integrin/VCAM-1 interaction activates alpha L beta 2 integrin-mediated adhesion to ICAM-1 in human T cells*. J Immunol, 2000. **164**(2): p. 746-53.
213. Groot, F., S. Welsch, and Q.J. Sattentau, *Efficient HIV-1 transmission from macrophages to T cells across transient virological synapses*. Blood, 2008. **111**(9): p. 4660-3.
214. Bachmann, M.F., et al., *Distinct roles for LFA-1 and CD28 during activation of naive T cells: adhesion versus costimulation*. Immunity, 1997. **7**(4): p. 549-57.
215. Groot, F., et al., *Dendritic cell-mediated HIV-1 transmission to T cells of LAD-1 patients is impaired due to the defect in LFA-1*. Retrovirology, 2006. **3**: p. 75.
216. Tuluc, F., et al., *Neurokinin 1 receptor isoforms and the control of innate immunity*. Trends Immunol, 2009. **30**(6): p. 271-6.
217. Harrowe, G., M. Mitsuhashi, and D.G. Payan, *Measles virus-substance P receptor interactions. Possible novel mechanism of viral fusion*. J Clin Invest, 1990. **85**(4): p. 1324-7.
218. They, C., et al., *Proteomic analysis of dendritic cell-derived exosomes: a secreted subcellular compartment distinct from apoptotic vesicles*. J Immunol, 2001. **166**(12): p. 7309-18.
219. Pileri, P., et al., *Binding of hepatitis C virus to CD81*. Science, 1998. **282**(5390): p. 938-41.
220. Bartosch, B., et al., *Cell entry of hepatitis C virus requires a set of co-receptors that include the CD81 tetraspanin and the SR-B1 scavenger receptor*. J Biol Chem, 2003. **278**(43): p. 41624-30.
221. Mittelbrunn, M., et al., *Cutting edge: dynamic redistribution of tetraspanin CD81 at the central zone of the immune synapse in both T lymphocytes and APC*. J Immunol, 2002. **169**(12): p. 6691-5.
222. Lin, Z., et al., *Comparative microarray analysis of gene expression during activation of human peripheral blood T cells and leukemic Jurkat T cells*. Lab Invest, 2003. **83**(6): p. 765-76.
223. Imai, T., et al., *Molecular analyses of the association of CD4 with two members of the transmembrane 4 superfamily, CD81 and CD82*. J Immunol, 1995. **155**(3): p. 1229-39.
224. Hemler, M.E., *Integrin associated proteins*. Curr Opin Cell Biol, 1998. **10**(5): p. 578-85.
225. Berditchevski, F., et al., *A novel link between integrins, transmembrane-4 superfamily proteins (CD63 and CD81), and phosphatidylinositol 4-kinase*. J Biol Chem, 1997. **272**(5): p. 2595-8.
226. Tardif, M.R. and M.J. Tremblay, *Tetraspanin CD81 provides a costimulatory signal resulting in increased human immunodeficiency virus type 1 gene expression in primary CD4+ T lymphocytes through NF-kappaB, NFAT, and AP-1 transduction pathways*. J Virol, 2005. **79**(7): p. 4316-28.
227. Avota, E., et al., *Measles virus interacts with and alters signal transduction in T-cell lipid rafts*. J Virol, 2004. **78**(17): p. 9552-9.
228. Avota, E., H. Harms, and S. Schneider-Schaulies, *Measles virus induces expression of SIP110, a constitutively membrane clustered lipid phosphatase, which inhibits T cell proliferation*. Cell Microbiol, 2006. **8**(11): p. 1826-39.

9 Abkürzungsverzeichnis

A	Ampere
Abb.	Abbildung
Ak	Antikörper
AP-3	Adapterprotein-3
APC	Antigen-präsentierende Zelle
APME	<i>Acute post measles encephalitis</i>
AS	Aminosäure
ATV	<i>Adjusted trypsin versene</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzw.	beziehungsweise
C	Cytosin
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CPE	<i>Cytopathic effect</i> , Zytopathischer Effekt
cSMAC	<i>Central supramolecular activation cluster</i>
Da	Dalton
DALIS	<i>DC aggresome-like inducible structures</i>
DC	Dendritische Zellen
DC-SIGN	<i>Dendritic cell-specific intercellular adhesion molecule (ICAM-3) grab- bing non-integrin</i> , CD209
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DRM	Detergenzresistente Membran
E. coli	Escherichia coli
EEA-1	Early endosome antigen 1
ED	Edmonston
EDT	Ethandithiol
ER	Endoplasmatisches Retikulum
ERM	Ezrin / Radixin / Moesin - Proteinkomplex
F	Phenylalanin
F-Aktin	Filamentöses Aktin

Abkürzungsverzeichnis

F-Protein	Fusionsprotein
FACS	<i>Fluorescence-activated cell sorter</i> , Durchflusszytometer
FCS	Fetales Kälberserum
FIP	Fusionsinhibitorisches Peptid
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FlAsH	<i>Fluorescence arsenical hairpin binder</i>
G	Glyzin
GFP	<i>Green fluorescent protein</i> , Grünfluoreszierendes Protein
GM-CSF	<i>Granulocyte-macrophage colony stimulation factor</i>
gp	Glykoprotein
H-Protein	Hämagglutinin-Protein
HIV-1	<i>Human immunodeficiency virus-1</i>
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule-1</i> , CD54
IF	Immunfluoreszenz
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IS	Immunologische Synapse
Iso	Isotype
IVW	Institut für Virologie / Würzburg
l	Liter
L-Protein	<i>Large-Protein</i>
LAMP-1	<i>Lysosomal-associated membrane protein-1</i>
LatB	Latrunculin B
LFA-1	<i>Lymphocyte function antigen-1</i>
LPS	Lipopolysaccharid
M	molar
M-Protein	Matrixprotein
MHC	<i>Major histocompatible complex</i>
MIBE	<i>Measles inclusion body encephalitis</i>
min	Minuten
moi	<i>Multiplicity of infection</i>
mRNA	Messenger-Ribonukleinsäure
MV	Masernvirus

Abkürzungsverzeichnis

MVB	<i>Multivesicular bodies</i>
N-Protein	Nukleokapsidprotein
Noco	Nocodazol
P	Prolin
P-Protein	Phosphatprotein
P/I	Phorbol 12-myristate 13-Acetat (PMA) / ionomycine
p.I.	Postinfektion
PBMC	<i>Peripheral blood mononuclear cells</i> , periphere mononukleäre Zellen des Blutes
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphat-gepufferte Saline
PFA	Paraformaldehyd
PFU	<i>Plaque forming units</i>
PLL	Poly-L-Lysin
pSMAC	<i>Peripheral supramolecular activation cluster</i>
RdRp	<i>RNA-dependent-RNA polymerase</i>
ReAsH	<i>resorufin arsenical hairpin binder</i>
RNP	Ribonukleoproteinkomplex
rpm	<i>Revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
Rr	Pearson´s Kolokalisationskoeffizient
RT	Raumtemperatur
s	Sekunde
SDS	Natrium-(<i>Sodium</i>) Dodecylsulfat
shRNA	<i>Short hairpin</i> - Ribonukleinsäure
siRNA	<i>Short interfering</i> - Ribonukleinsäure
SLAM	<i>Signaling lymphocyte activation molecule</i> , CD150
SSPE	<i>Subacute sclerosing panencephalitis</i> , subakute sklerotisiernede Panencephalitis
TC	Tetracysteine
TCR	<i>T cell receptor</i> , T-Zell-Rezeptor
TCID ₅₀	<i>Tissue culture infectious dosis 50</i>
TEM	<i>Tetraspanin-enriched microdomains</i>
TGN	<i>Trans-Golgi network</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>

Abkürzungsverzeichnis

U	Unit
VLP	<i>Virus like particles</i>
VS	Virologische Synapse
WB	Western Blot
WGA	<i>Wheat germ agglutinin</i>
WTF	Wildtyp Fleckenstein

10 Veröffentlichungen

10.1 Publikationen

Salditt A, **Koethe S**, Pohl C, Harms H, Kolesnikova L, Becker S, Schneider-Schaulies S (2010) Measles virus M protein-driven particle production does not involve the endosomal sorting complex required for transport (ESCRT) system. *J. Gen Virol.* **91**: 1464-72

Koethe S, Avota E, Schneider-Schaulies S (2012) Measles virus transmission from dendritic cell to T cells: formation of synapse-like interfaces concentrating viral and cellular components. *J Virol* accepted

10.2 Vorträge

2008 XVIII. Measles Meeting. Subcellular redistribution of measles virus components in dendritic cells. Würzburg

2009 DFG Schwerpunktprogramm 1175. Measles virus protein trafficking, sorting in dendritic cells & transmission to T cells. Günzburg

GfV-Arbeitskreis "Zellbiologie viraler Infektionen". Measles virus protein trafficking, sorting in dendritic cells & transmission to T cells. Deidesheim

XIX. Measles Meeting. Measles virus protein trafficking, sorting in dendritic cells & transmission to T cells. Würzburg

2010 SPP 1175 Symposium. Measles virus M protein subcellular distribution in dendritic cells – towards identification of trafficking pathways. Heidelberg

XX. Measles Meeting. Subcellular trafficking of MV proteins in dendritic cells & MV transmission to T cells. Würzburg

5th Network Meeting of the Graduate School of Life Sciences of the University Würzburg, Erlangen and Tübingen. Subcellular distribution of Measles virus

Veröffentlichungen

- proteins in infected dendritic cells. Kloster Schöntal
- 2011 Society of General Microbiology Spring Conference. Measles virus transmission from infected dendritic cells to autologous T cells in DC / T cell conjugates. Harrogate (UK)
- XXI. Measles Meeting. Measles virus transmission from infected dendritic cells to autologous T cells in DC / T cell conjugates. Würzburg

10.3 Poster

- 2008 3rd Network Meeting of the Graduate School of Life Sciences of the University Würzburg, Erlangen and Tübingen. Subcellular redistribution of measles virus structural proteins in infected cells. Wildbad / Rothenburg ob der Tauber
- 2009 19th Annual Meeting of the Society for Virology. Distribution of Measles virus proteins in dendritic cells. Leipzig
1. Joint Congress of the Swiss and German Societies of Cell Biology. Distribution of Measles virus proteins in dendritic cells. Konstanz
- 4th Network Meeting of the Graduate School of Life Sciences of the University Würzburg, Erlangen and Tübingen. Distribution of Measles virus protein in dendritic cells. Kloster Schöntal
- 2010 5th International doctoral student symposium of the GSLS. Distribution of Measles virus protein in dendritic cells. Würzburg
- 2011 21st Annual Meeting of the Society for Virology. Measles virus transmission from infected dendritic cells to autologous T cell in DC / T cell conjugates. Freiburg

